



HAL
open science

Développement, pathogénicité et métabolisme secondaire chez *Penicillium expansum*: implication de VelB et LaeA, deux facteurs de transcription du complexe velvet

Nadia Tahtah

► **To cite this version:**

Nadia Tahtah. Développement, pathogénicité et métabolisme secondaire chez *Penicillium expansum*: implication de VelB et LaeA, deux facteurs de transcription du complexe velvet. Autre [q-bio.OT]. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT; Université Saint-Joseph (Beyrouth), 2022. Français. NNT: 2022INPT0097 . tel-04248350

HAL Id: tel-04248350

<https://theses.hal.science/tel-04248350>

Submitted on 18 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Infectiologie, Physio-pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme NADIA TAHTAH

le mercredi 14 décembre 2022

Titre :

Développement, pathogénicité et métabolisme secondaire chez
Penicillium expansum : implication de VelB et LaeA, deux facteurs de
transcription du complexe velvet

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Toxicologie Alimentaire (ToxAlim)

Directeur(s) de Thèse :

M. OLIVIER PUEL

M. ANDRE EL KHOURY

Rapporteurs :

MME CAROLINE STRUB, UNIVERSITE DE MONTPELLIER

MME MONIKA COTON, UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Membre(s) du jury :

MME FLORENCE MATHIEU, TOULOUSE INP, Président

M. ALI ATOUI, UNIVERSITE LIBANAISE, Membre

M. ANDRE EL KHOURY, UNIVERSITE ST JOSEPH DE BEYROUTH, Membre

M. OLIVIER GROVEL, UNIVERSITE DE NANTES, Membre

M. OLIVIER PUEL, INRA TOULOUSE, Membre

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'UMR1331 TOXALIM (Centre de Recherche en Toxicologie Alimentaire), de l'INRAE de Toulouse et du Laboratoire Caractérisation et Transformation des Agro-ressources « CTA », de l'Université Saint Joseph de Beyrouth.

Je le considère comme mon meilleur investissement, jusqu'à présent. Ce fut une expérience enrichissante à tous les niveaux : scientifique, personnel et culturel. Elle a développé en moi une plus grande curiosité et une passion pour le monde des mycotoxines et de la toxicologie alimentaire.

Tout d'abord, je tiens à remercier les rapporteurs, **Mme Caroline STRUB**, **Mme Monika COTON** et **M. Olivier GROVEL** ainsi que tous les membres du jury, **Mme Florence MATHIEU**, **M. Ali ATOUI**, **M. André EL KHOURY** et **M. Olivier PUEL** qui m'ont fait l'honneur d'accepter de prendre le temps de réviser et d'examiner cette thèse.

Je tiens également à exprimer ma sincère gratitude à **Mme Isabelle Oswald**, directrice de l'unité UMR 1331 TOXALIM, qui m'a accueilli dans le laboratoire et m'a donné la confiance nécessaire à la réalisation de mon travail. J'apprécie et respecte énormément la femme scientifique et la directrice que vous êtes. Vos compétences, votre esprit scientifique, la façon dont vous pensez et vous agissez m'ont beaucoup appris !

Un sincère remerciement va également au doyen de la Faculté des Sciences de l'USJ de Beyrouth, **M. Richard MAROUN**. Merci de m'avoir donné la confiance et la chance pour réaliser ce projet.

Je tiens ensuite à remercier mes encadrants de thèse :

M. Olivier Puel pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe E05 et pour avoir encadré mes travaux de recherche depuis ma deuxième année de Master et jusqu'à la fin de ma thèse.

Je serai pour toujours reconnaissante du soutien et des efforts qu'il a fait pour rendre possible la réalisation de ma thèse, malgré les conditions très dures qu'on a rencontré. Merci Olivier d'avoir partagé tes connaissances scientifiques et de m'avoir transmis ton enthousiasme pour la recherche ainsi que ta passion pour la patuline ... Tes idées précieuses concernant le projet m'ont toujours poussé à réfléchir plus rapidement et de façon plus ciblée, à sélectionner mes problèmes et à les résoudre. Et finalement, je te remercie pour tout le temps et les efforts que tu as consacré pour la correction de mes publications et de ce manuscrit.

André EL KHOURY pour la confiance qu'il m'a donné depuis que j'étais au Liban, pendant toute la période où j'ai travaillé dans le laboratoire de l'USJ, jusqu'au moment où il m'a proposé de faire mon stage de fin d'étude à Toulouse. Je n'oublierai jamais le jour où tu m'as appelé pour me dire qu'on a eu le financement et que je pourrai faire ma thèse à TOXALIM. Je te remercie de m'avoir toujours guidée, encouragée, conseillée et soutenue pendant les hauts et les bas. Tu as toujours été là pour moi, pour écouter mes problèmes et m'aider à les résoudre.

Je tiens à adresser un remerciement particulier à **Mme Sophie Lorber**. Ta présence depuis mon arrivée à TOXALIM a été primordiale pour moi. Merci pour ton soutien professionnel, mais surtout pour ton soutien personnel. Je te le dis toujours, et je te le redis encore, tu es pour moi, ma deuxième maman en France. D'abord, merci de m'avoir aidé dans beaucoup de mes manip, merci d'avoir corrigé mes papiers, mes présentations, et ce manuscrit. Pendant mes moments les plus difficiles, tu as été là pour moi, tu as écouté mes problèmes et tu m'as toujours donné les meilleurs des conseils. Je te serai pour toujours reconnaissante !

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres de l'équipe E05, l'équipe de Biosynthèse et Toxicité des Mycotoxines pour leur gentillesse, leur soutien, et leur aide depuis février 2018.

M. Ali ATOUI, merci pour tes encouragements depuis ma deuxième année de Master, pour ton implication dans mon projet et dans la correction de mon papier et de ce manuscrit. C'est grâce à toi, à la façon dont tu nous a introduit la biologie moléculaire que j'ai trouvé une passion pour ce domaine.

Philippe, Joelle, Sylvie, Laura S., Delphine, Marie, Marion, Bernadette, Michel, Amanda, Manon, Chloé, Tarek, Abdullah, Su ... De très belles personnes que j'ai rencontré pendant mon séjour ici, qui m'ont beaucoup appris, et qui m'ont beaucoup aidé. J'ai toujours apprécié les échanges avec vous, que ce soit pendant les réunions, les petites discussions dans le couloir, à la cantine, ou autour d'un café. J'espère pouvoir rencontrer des gens comme vous dans mon nouveau milieu de travail.

Les mots ne pourront jamais être suffisants pour te remercier, **Carine AL-AYOUBI**. Quand tu es arrivée à TOXALIM en 2019, je n'aurais jamais pensé que tu seras aujourd'hui l'une des personnes les plus importantes dans ma vie. Merci de m'avoir supportée, je sais que c'est pas du tout facile. Tu as toujours été là pour moi, tu as partagé mes succès et mes hauts, mais tu as surtout partagé mes bas, mes déceptions, mes chutes et c'est toi qui m'as toujours aidé à me remettre debout et à continuer. Tu es une très belle personne, à qui je tiens énormément (et pas seulement parce que tu connais tous mes secrets). Je te promets de continuer à t'embêter pour très longtemps – until we are old and grey -.

Des collègues qui sont vite devenues les meilleures des copines, **Chrys, Ophélie** et **Alix**, MERCI ! Merci **Chrys** de m'avoir tout appris et de m'avoir aidé à tout faire au labo depuis mon premier jour. Ton sourire et ta fameuse « ne t'inquiètes pas, je suis toujours là » était pour

moi un énorme support. Sans le savoir, tu m'as beaucoup appris et tu m'as énormément aidé, pas que sur le plan professionnel. Emiliano est très chanceux, il a la meilleure des mamans, et ben ... la meilleure des Tatis aussi (Il le verra dans 16 ans).

Ma petite **Ophélie**, même quand tu es partie du labo, je te sentais toujours avec moi. Tu étais toujours à mon écoute, tu m'as toujours soutenue et pour ça je te suis reconnaissante. Ma « drinking buddy », mon dictionnaire, et surtout mon psychologue, merci pour tout !

Alix, tes conseils étaient et sont toujours pour moi d'une énorme importance. Ta positivité et ta gentillesse sont des qualités que j'adore en toi ! Merci pour tout ma 'Halloween Freak'.

San Sébastien, DONE ! Mais la liste reste très longue. **NOCCA** ! Je vous aime.

Je tiens également à remercier les autres membres de TOXALIM que j'ai rencontré durant ces années et qui m'ont tous soutenu et aidé, directement ou indirectement, à un moment donné.

Isabelle Pinson, un grand merci du plus profond de mon cœur ! D'abord, merci pour ta disponibilité et ta capacité à t'adapter à notre rythme de travail. Mais surtout Merci de prendre soin de moi, merci pour la façon dont tu t'inquiètes pour moi, merci pour tout !

Saleha, Aurélia pour toute leur gentillesse, leurs encouragements et pour toutes les discussions et les moments passés avec vous.

Yannick et **Claire** pour votre aide et votre implication dans les projets et dans mon papier.

Emilien pour ton aide dans les analyses MS et dans le papier.

Théo et Vincent pour votre soutien professionnel et amical durant cette période, je ne saurais jamais m'en sortir avec le monde mystérieux de l'informatique si ce n'était pas pour vous.

Yann, pour nos discussions autour d'un « coca ZERO ». Je peux t'assurer que tu auras été d'une présence précieuse durant ces derniers mois.

Pour finir mes remerciements, les plus sincères vont à ma famille et à mes amis. La liste risque d'être un peu trop longue.

Romy, Nicole, Reine, Joanna, Layal, Yara G., Yara S., Laury, Abbas, Makram, Jad, Samer, Iyad, Mahmoud. La **Familia**. Ça fait 20 ans que vous êtes dans ma vie, que vous me soutenez et que vous êtes à mes côtés. Je suis très chanceuse d'avoir des vrais amis comme vous dans ma vie.

Et toi, qui est là depuis 24 ans, la personne avec laquelle j'ai grandi, la personne avec laquelle j'ai tout fait pour la première fois, la personne qui ne m'a jamais abandonné. Ma meilleure amie, la sœur que la vie m'a donnée. La distance n'a jamais pu affecter la relation que j'ai avec toi. Merci pour ton soutien, merci d'être dans ma vie. Je t'aime ma **Romy**.

En arrivant à Toulouse, je n'ai jamais pensé que j'allais rencontrer des gens comme vous. Je n'ai jamais pensé qu'un jour j'aurai une petite famille sans laquelle je ne peux plus imaginer être capable de vivre et de survivre. Je sais que ces derniers mois étaient durs pour vous comme ils étaient pour moi. Mais vous ne m'avez jamais déçu. Vous étiez toujours là pour moi. Sans vous, je n'aurais jamais été capable de dépasser tout ce qui s'est passé cette année. **Ali, Nour, Laura, Mouin, Nado et Nasri**, si je vous écris des pages et des pages je ne pourrais jamais vous dire à quel point je vous suis reconnaissante. **You are, my home away from home.** Je vous aime plus que tout.

Je ne sais pas quoi te dire, parce que n'importe ce que je dis et ce que j'écris, tu mérites mille fois plus. Ma meilleure amie, ma sœur, ma coloc, ma mère, mon psychologue, mon clown, mon médecin traitant et la liste peut continuer encore. **Laura**, tu es, parmi toutes les personnes que j'ai remerciées, celle à qui je dois le plus. Tu es la personne qui a supporté mon mauvais caractère, mes crises de colère, mes plus mauvaises réactions. Avant de te remercier, je dois commencer par m'excuser parce que je sais que tu as dû vivre quelques mois très difficiles avec moi. Mais ce n'est pas ces derniers mois seulement, depuis que je t'ai connu il y a 4 ans maintenant, tu as toujours été la plus belle personne dans ma vie. On a vécu ensemble le pire mais aussi le meilleur. Merci d'être toi, merci d'être dans ma vie, toujours là pour moi et avec moi. Je t'aime le plus, pour toujours.

A toi, la personne de laquelle je suis tombée amoureuse à 19 ans. Malgré les moments très difficiles qu'on a vécus, l'amour a triomphé à la fin et te voilà à mes côtés au moment où je vais réaliser le plus grand de mes rêves. Des erreurs on en fait tous, mais l'amour qu'on partage était plus fort que nous. J'ai hâte de partager pleins d'autres succès avec toi. Tu as réussi à rendre la fin de cette thèse la moins dure possible. On tourne cette page, et notre aventure commence. Je t'aime.

Et finalement, le plus grand merci va à ma petite famille, ma maman, mon papa et mon frère. C'est à cause de vous que je suis là aujourd'hui. Merci pour tous les sacrifices que vous avez fait pour moi, pour que je puisse être la femme que je suis aujourd'hui. Tout ce que je suis aujourd'hui, je le dois à vous. J'espère que je suis à la hauteur de vos attentes. Je vous offre le fruit de ce travail. Je vous aime. Vous êtes la source de ma force.

'Tu n'es plus là où tu étais, mais tu es partout là où je suis'. Je t'aime, jeddo.

TAHTAH N. 2022

PhD director: Olivier Puel

PhD co-director: André El Khoury

Title: Development, pathogenicity, and secondary metabolism in *Penicillium expansum*: involvement of VelB and LaeA, two transcription factors of the velvet complex

Abstract:

Penicillium expansum, the causal agent of blue mold disease in apples, is one of the most studied filamentous fungi of the genus *Penicillium*. This plant pathogenic fungus can infest many fruits during harvest and throughout the storage period and produces mainly the mycotoxin patulin. However, patulin is not the only mycotoxin produced by *P. expansum*, as it produces a wide variety of secondary metabolites including citrinin and chaetoglobosin A. In filamentous fungi, genes encoding proteins involved in secondary metabolism are organized into clusters. Secondary metabolism is regulated by specific or global transcription factors. Specific transcription factors are encoded by genes that are located in the biosynthetic gene cluster and act directly on all other genes located in the same cluster. These specific transcription factors are controlled by global transcription factors, which are encoded by genes outside the biosynthetic gene cluster and are affected by environmental cues. The light-dependent velvet complex, involving three global transcription factors: VelB, LaeA and VeA, plays an important role in the regulation of development, sporulation, pathogenicity and secondary metabolism in many fungal species.

Characterization of the role of VelB, LaeA and VeA in the regulation of secondary metabolism as well as several physiological processes is essential to understand the behavior of this microscopic fungus.

In this context, the first objective of this thesis was to investigate the involvement of these three transcription factors in fungal development and secondary metabolism in *P. expansum*. At first, we performed an in vivo study and the behavior of all three *PeΔvelB*, *PeΔlaeA*, and *PeΔveA* mutant strains was compared to that of the WT strain on Golden Delicious apples. All three strains were able to colonize apples, but at a lower rate than the WT strain. However, the *PeΔveA* strain was the only strain that was unable to pierce the wall of apples and to emerge from the fruit to complete its life cycle. VeA was thus the only member of the velvet complex that regulates the release of the fungus through the formation of coremia. We thereafter performed transcriptomic analysis on the *PeΔvelB*, *PeΔlaeA*, and *PeΔveA* mutant strains. Independently, each of these global transcription factors showed its involvement in the regulation of the expression of genes involved in secondary metabolite biosynthesis, conidiation, nitrate assimilation, biosynthesis of ergosterol and siderophores.

A second objective of the thesis was to determine the interactions between the three members of the velvet complex. In order to control the production of secondary metabolites by filamentous fungi, an understanding of the overall regulatory processes is essential. Our results indicate that the three components act concomitantly in regulating the production of several secondary metabolites such as patulin, citrinin and chaetoglobosin A, which are positively regulated by VelB, LaeA and VeA, as well as in various developmental processes. However, some genes involved in conidiation or secondary metabolite biosynthesis are regulated differently by members of this complex.

Key-words: *Penicillium expansum*, VelB, LaeA, secondary metabolism, patulin, citrinin, chaetoglobosin A, fumarylalanine, siderophore, ergosterol, microarray, metabolomics

Discipline: Pathology, Toxicology, Genetic and Nutrition

Name and address of the Institute:

National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE)
UMR 1331 TOXALIM - INRAE/INPT/UPS
Team Biosynthesis and Toxicity of Mycotoxins
180 Chemin de Tournefeuille – BP 93173
F-31027 Toulouse cedex 3

TAHTAH N. 2022

Directeur de thèse : Olivier Puel

Codirecteur de thèse : André El Khoury

Titre : Développement, pathogénicité et métabolisme secondaire chez *Penicillium expansum* : implication de VelB et LaeA, deux facteurs de transcription du complexe velvet

Résumé :

Penicillium expansum, l'agent causal de la maladie de pourriture bleue dans les pommes, est l'un des champignons filamenteux les plus étudiés du genre *Penicillium*. Ce champignon phytopathogène peut infester de nombreux fruits pendant la récolte et tout au long de la période de stockage en produisant principalement la patuline. Cependant, la patuline n'est pas la seule mycotoxine produite par *P. expansum*, puisque ce dernier produit une grande variété de métabolites secondaires tels que la citrinine et la chaétoglobosine A. Chez les champignons filamenteux, les gènes codant pour les protéines impliquées dans le métabolisme secondaire sont organisés en clusters. Le métabolisme secondaire est régulé par des facteurs de transcription spécifiques ou globaux. Les facteurs de transcription spécifiques sont codés par des gènes qui sont situés dans le cluster de gènes biosynthétiques et qui agissent directement sur tous les autres gènes situés dans ce même cluster. Ces facteurs de transcription spécifiques sont contrôlés par des facteurs de transcription globaux, codés par des gènes situés en dehors du cluster biosynthétique et qui sont affectés par des stimuli environnementaux. Le complexe velvet, dépendant de la lumière, et impliquant trois facteurs de transcription globaux : VelB, LaeA et VeA, joue un rôle important dans la régulation du développement, de la sporulation, de la pathogénicité et du métabolisme secondaire chez de nombreuses espèces fongiques.

La caractérisation du rôle de VelB, LaeA et VeA dans la régulation du métabolisme secondaire ainsi que de plusieurs processus physiologiques est essentielle pour comprendre le comportement de ce champignon microscopique.

Dans ce contexte, le premier objectif de cette thèse a consisté à investiguer l'implication de ces trois facteurs de transcription dans le développement fongique et le métabolisme secondaire chez *P. expansum*. Pour cela, nous avons réalisé une évaluation de la croissance *in vivo* et le comportement des trois souches mutantes, $Pe\Delta velB$, $Pe\Delta laeA$, et $Pe\Delta veA$, a été comparé à celui de la souche sauvage sur des pommes Golden Delicious. Les trois souches ont été capables de coloniser les pommes, mais à une vitesse inférieure à celle de la souche sauvage. Cependant, la souche $Pe\Delta veA$ a été la seule souche incapable de percer la paroi des pommes et de sortir du fruit pour compléter son cycle de vie. Cela montre que VeA est le seul membre du complexe velvet qui régule la libération du champignon à travers la formation de corémies. Nous avons ensuite réalisé une analyse transcriptomique des trois souches mutantes. Indépendamment, chacun de ces facteurs de transcription globaux a montré son implication dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse de métabolites secondaires, la conidiation, l'assimilation du nitrate, la biosynthèse de l'ergostérol et des sidérophores.

Un second objectif de la thèse était de déterminer les interactions existantes entre ces trois membres du complexe velvet et quels étaient les gènes, les fonctions régulées directement ou indirectement par le complexe velvet. Afin de contrôler la production de métabolites secondaires par les champignons filamenteux, la compréhension des processus de régulation globale est essentielle. Les résultats indiquent que le complexe velvet est impliqué dans la régulation de la production de plusieurs métabolites secondaires tels que la patuline, la citrinine et la chaétoglobosine A, qui sont régulées positivement par VelB, LaeA et VeA ainsi que dans celle de divers processus de développement. Cependant, certains gènes impliqués dans la conidiation ou la biosynthèse de métabolites secondaires peuvent être régulés différemment par les membres de ce complexe.

Mots-clés : *Penicillium expansum*, VelB, LaeA, métabolisme secondaire, patuline, citrinine, chaétoglobosine A, fumarylalanine, sidérophore, ergostérol, microarray, métabolomique

Discipline : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Intitulé et adresse de l'Institut :

Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE)

UMR 1331 TOXALIM - INRAE/INPT/UPS
Equipe Biosynthèse et Toxicité des Mycotoxines
180 chemin de Tournefeuille – BP 93173
F-31027 Toulouse cedex 3

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES



COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Liste de publications

1. **Implication of VelB in the development, pathogenicity, and secondary metabolism of *Penicillium expansum*. Nadia Tahtah**, Chrystian Zetina-Serrano, Ophélie Rocher, Claire Naylies, Yannick Lippi, André El Khoury, Ali Atoui, Emilien L. Jamin, Isabelle P. Oswald, Sophie Lorber, Olivier Puel*.
doi: 10.1016/j.postharvbio.2022.112121
2. **Secondary metabolism of *Penicillium spp.* and its regulation**
Christelle El Hajj Assaf, Chrystian Zetina-Serrano, **Nadia Tahtah**, André Khoury, Ali Atoui, Isabelle P. Oswald, Olivier Puel* and Sophie Lorber. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 9462. doi:10.3390/ijms21249462
3. **LaeA, a master gene in the development, pathogenicity, and secondary metabolism of *Penicillium expansum*. Nadia Tahtah**, Chrystian Zetina-Serrano, Ophélie Rocher, Selma P. Snini, Claire Naylies, Yannick Lippi, Emilien L. Jamin, Isabelle P. Oswald, Sophie Lorber, Olivier Puel* (Article en préparation).

Liste des communications orales

1. **Nadia Tahtah**, Chrystian Zetina-Serrano, Ophélie Rocher, Claire Naylies, Yannick Lippi, André El Khoury, Ali Atoui, Emilien L. Jamin, Isabelle P. Oswald, Sophie Lorber, Olivier Puel. Regulation of development and secondary metabolism in *Penicillium expansum* by the transcription factor VelB. 43rd Mycotoxin Workshop, May 30 – June 01 2022, Toulouse, France.
2. **Nadia Tahtah**, Chrystian Zetina-Serrano, Ophélie Rocher, Claire Naylies, Yannick Lippi, André El Khoury, Ali Atoui, Emilien L. Jamin, Isabelle P. Oswald, Sophie Lorber, Olivier Puel. Regulation of development and secondary metabolism in *Penicillium expansum* by the transcription factor VelB. ½ Journée des Graines de ToxAlim, 03 juin 2022, Toulouse, France.
3. **Chrystian Zetina-Serrano**, Nadia Tahtah, Ophélie Rocher, Claire Naylies, Emilien L. Jamin, Sophie Lorber, Olivier Puel. Regulation of secondary metabolism in *Penicillium expansum* by the Velvet Complex. 9^{ème} édition des Journées Mycotoxines, 22-23 septembre 2022, Marseille, France.

TABLE DES MATIERES

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	xiii
LISTE DES FIGURES.....	xxi
LISTE DES TABLEAUX	xxvii
LISTE DES ABREVIATIONS	xxix
INTRODUCTION.....	1
CONTEXTE DE L'ETUDE	3
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I. Moisissures, métabolites secondaires et mycotoxines.....	9
I.1. Les moisissures	9
I.2. Les champignons filamenteux et leurs métabolites secondaires.....	10
I.3. Les mycotoxines	11
II. <i>Penicillium expansum</i>	14
II. 1. Taxonomie et morphologie	14
II. 2. Caractéristiques biologiques, physiologiques et mode d'infection	16
II.3. Métabolites secondaires produits par <i>Penicillium expansum</i>	17
II.4. Voies de biosynthèse des métabolites secondaires produits par <i>P. expansum</i>	29
II.5. Pathogénicité et contrôle	40
III. La reproduction chez les champignons filamenteux	46
III.1. La reproduction asexuée chez les champignons filamenteux.....	46
III.2. La reproduction sexuée chez les genres <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>	50
III.3. La régulation de la reproduction par VelB et LaeA chez les champignons filamenteux	51
IV. Régulation du métabolisme secondaire chez les <i>Aspergillaceae</i>	55
1. Regulation of secondary metabolism in the <i>Penicillium</i> genus: Review – International Journal of Molecular Science (Accepté)	55
1. Introduction	57
2. Regulation of Secondary Metabolism	59
2.1. Specific Transcription Factors/Cluster-Specific Regulators	59

2.2. Environmental Signals and Associated Regulators.....	62
2.3. Signal Transduction Pathways	68
2.3.1. cAMP Pathways.....	69
2.3.2. The Osmostress Response Pathway	69
2.4. Epigenetic Regulation	69
3. Conclusion.....	71
2. Le complexe velvet.....	86
TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	95
Chapitre 1	97
Implication de VelB dans le développement, la pathogénicité et le métabolisme secondaire chez <i>Penicillium expansum</i>	97
RÉSUMÉ DE L'ÉTUDE	99
ABSTRACT	101
Introduction	101
Material and methods	102
Results	103
Discussion	107
Conclusion	110
Supporting information.....	110
Chapitre 2	148
Implication de LaeA dans le développement, la pathogénicité et le métabolisme secondaire chez <i>Penicillium expansum</i>	148
RÉSUMÉ DE L'ÉTUDE	150
ABSTRACT	153
INTRODUCTION.....	154
EXPERIMENTAL PROCEDURES	158
RESULTS.....	162
DISCUSSION	173
CONCLUSION	177

SUPPORTING INFORMATION.....	110
Chapitre 3	206
Résultats complémentaires : Analyse transcriptomique du mutant nul $Pe\Delta veA$	206
INTRODUCTION.....	208
MATERIELS ET METHODES	209
RESULTATS	210
DISCUSSION	216
CONCLUSION	219
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	220
CONCLUSION.....	245
REFERENCES.....	249

LISTE DES FIGURES

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

II. *Penicillium expansum*

Figure 1. Arbre phylogénétique pour la famille des <i>Aspergillaceae</i> -----	14
Figure 2. Apparence morphologique de <i>Penicillium expansum</i> NRRL 35695 -----	15
Figure 3. A) La voie de biosynthèse de la patuline -----	31
Figure 3. B) Représentation schématique du cluster de la patuline chez <i>P. expansum</i> -----	31
Figure 4. A) La voie de biosynthèse de la citrinine -----	34
Figure 4. B) Représentation schématique du cluster de la citrinine chez <i>Monascus ruber</i> -----	34
Figure 5. A) La voie de biosynthèse de la roquefortine C -----	36
Figure 5. B) Représentation schématique du cluster de la roquefortine C chez <i>P. expansum</i> -----	36
Figure 6. A) La voie de biosynthèse des communésines -----	37
Figure 6. B) Représentation schématique du cluster des communésines chez <i>P. expansum</i> -----	37
Figure 7. Comparaison du cluster des chaetoglobosines chez la souche d1 de <i>Penicillium expansum</i> et la souche <i>Chaetomium globosum</i> -----	38
Figure 8. Cluster des andrastines chez <i>Penicillium expansum</i> -----	39
Figure 9. Les facteurs de virulence et de régulation impliqués dans la pathogénèse de <i>P. expansum</i> -----	41

III. La reproduction chez les champignons filamenteux

Figure 10. Schéma de la voie de régulation de la conidiation chez <i>A. fumigatus</i> -----	48
Figure 11. Activateurs du développement en amont de la CRP -----	49

IV. Régulation du métabolisme secondaire chez les *Aspergillaceae*s

Figure 12. Biosynthetic pathways of secondary metabolites -----	58
Figure 13. Gene clusters of the patulin biosynthesis pathway -----	59

Figure 14. Global regulatory proteins involved in the regulation of gene clusters involved in the production of various secondary metabolites in <i>Penicillium</i> -----	63
Figure 15. Operating model of the velvet complex in <i>Aspergillus nidulans</i> -----	66
Figure 16. Architecture des domaines des protéines de la famille Velvet et de LaeA chez <i>Aspergillus nidulans</i> -----	86
Figure 17. Les complexes moléculaires formés par les protéines de la famille velvet et les méthyltransférases sur le contrôle du développement fongique et de la production de métabolites secondaires -----	91

TRAVAIL EXPERIMENTAL

Chapitre 1 : Implication de VelB dans le développement, la pathogénicité et le métabolisme secondaire chez *Penicillium expansum*

Figure 18. Morphological appearance of <i>Penicillium expansum</i> wild type, Pe Δ velB, and Pe Δ velB:velB strains -----	104
Figure 19. Golden Delicious' apples infected with the WT, Pe Δ velB, and Pe Δ velB:velB strains.	104
Figure 20. Quantification of conidiation A) in the light and B) in the dark -----	105
Figure 21. Spore viability assays performed A) in the light and B) in the dark -----	106
Figure 22. Log ₂ fold change (log ₂ FC) in the expression of genes belonging to the clusters involved in patulin, citrinin, and chaetoglobosin A biosynthesis in the WT and Pe Δ velB strains -----	106
Figure 23. Relative expression of 19 genes encoding other backbone enzymes (dimethylallyl tryptophan synthases (DMATs), terpene cyclases, non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs), NRPS like, polyketide synthases (PKSs) identified in the d1 strain genome -----	107
Figure 24. Patulin, citrinin, and chaetoglobosin A production on malt extract agar (MEA) and potato dextrose agar (PDA) media by the WT, Pe Δ velB, and Pe Δ velB:velB strains -----	109
Figure 25. Relative quantification by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry of fumarylalanine in apple flesh from 30 days post-inoculation in apples inoculated with the WT and Pe Δ velB strains and kept at 25 °C in the dark -----	110

SUPPORTING INFORMATION

SUPPLEMENTARY FIGURE 1. Validation of deletion and complementation by PCR analyses of genomic DNA of <i>Penicillium expansum</i> wild-type NRRL 35695 (WT), null mutant Pe Δ velB, and complemented Pe Δ velB:velB strains -----	119
SUPPLEMENTARY FIGURE 2. Genome walking (GW) analyses of genomic DNA of <i>Penicillium expansum</i> wild type NRRL 35695 and null mutant Pe Δ velB strains -----	120

SUPPLEMENTARY FIGURE 3. Validation of the mutant by quantitative real-time PCR analysis	123
SUPPLEMENTARY FIGURE 4. Rot growth rates obtained from ‘Golden Delicious’ apples infected with <i>Penicillium expansum</i> wild type NRRL 35695, the null mutant <i>PeΔvelB</i> , and the complemented <i>PeΔvelB:velB</i> strains	124
SUPPLEMENTARY FIGURE 5. Relative gene expression of the citrinin biosynthetic gene cluster (PEXP_005510-PEXP_005600) in <i>Penicillium expansum</i> wild type NRRL 35695 and the null mutant <i>PeΔvelB</i> strains by RT-qPCR	127
SUPPLEMENTARY FIGURE 6. Relative gene expression of the nine genes (patB, patE, patG, patH, patI, patL, patK, patM, and patO) of the patulin biosynthetic gene cluster in <i>Penicillium expansum</i> wild type NRRL 35695 and the null mutant <i>PeΔvelB</i> strains by RT-qPCR	128
SUPPLEMENTARY FIGURE 7. Relative gene expression of the chaetoglobosin biosynthetic gene cluster (PEXP_073960-PEXP_074060) in <i>Penicillium expansum</i> wild type NRRL 35695 and the null mutant <i>PeΔvelB</i> strains by RT-qPCR	129
SUPPLEMENTARY FIGURE 8. Chromatogram showing the relative quantification by LC-MS of citrinin extracted from 30 dpi apples infected with the WT and <i>PeΔvelB</i> strains	130
SUPPLEMENTARY FIGURE 9. A) Chromatograms showing the relative quantification by LC-MS of chaetoglobosin A extracted from 30 dpi apples infected with the WT and <i>PeΔvelB</i> strains	131
SUPPLEMENTARY FIGURE 9. B) MS/MS spectrum of chaetoglobosin A	132
SUPPLEMENTARY FIGURE 10. A) MS/MS spectra of unknown secondary metabolite m/z 319	135
SUPPLEMENTARY FIGURE 10. B) MS/MS spectra of unknown secondary metabolite m/z 305 RT: 30.52	136
SUPPLEMENTARY FIGURE 10. C) MS/MS spectra of unknown secondary metabolite m/z 305 RT: 29.91	137
SUPPLEMENTARY FIGURE 10. D) MS/MS spectra of unknown secondary metabolite m/z 295 RT: 12.77	138
SUPPLEMENTARY FIGURE 10. E) MS/MS spectra of unknown secondary metabolite m/z 293 RT: 11.66	139
SUPPLEMENTARY FIGURE 10. F) MS/MS spectra of unknown secondary metabolite m/z 293 RT: 15.64	140
SUPPLEMENTARY FIGURE 10. G) MS/MS spectra of unknown secondary metabolite m/z 291 RT: 23.81	141
SUPPLEMENTARY FIGURE 10. H) MS/MS spectra of unknown secondary metabolite m/z 291 RT: 25.53	142
SUPPLEMENTARY FIGURE 10. I) MS/MS spectra of unknown secondary metabolite m/z 291 RT: 13.28	143
SUPPLEMENTARY FIGURE 11. MS/MS spectra of fumarylalanine detected in the null mutant <i>PeΔvelB</i> strain	144
SUPPLEMENTARY FIGURE 12. Alignment of partial sequences of β-tubulin gene from <i>Penicillium resticulosum</i> CBS 609.94, <i>Penicillium expansum</i> CBS325.48 (neotype), <i>P. expansum</i> strain d1 (reference genome)	145

Chapitre 2 : Implication de LaeA dans le développement, la pathogénicité et le métabolisme secondaire chez *Penicillium expansum*

- Figure 26.** Morphological appearance of *Penicillium expansum* wild type, *PeΔlaeA*, and *PeΔlaeA:laeA* strains -----163
- Figure 27.** ‘Golden Delicious’ apples infected with the WT, *PeΔlaeA*, and *PeΔlaeA:laeA* strains ----164
- Figure 28.** Log₂ fold change (log₂FC) in the expression of genes belonging to the clusters involved in patulin, citrinin, and chaetoglobosin A biosynthesis in the WT and *PeΔlaeA* strains -----166
- Figure 29.** Relative expression of 17 genes encoding other backbone enzymes (dimethylallyl tryptophan synthases (DMATSs), terpene cyclases, non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs), NRPS like, polyketide synthases (PKSs) identified in the d1 strain genome -----168
- Figure 30.** Patulin and chaetoglobosin A production on malt extract agar (MEA) and potato dextrose agar (PDA) media by the WT, *PeΔlaeA*, and *PeΔlaeA:laeA* strains -----172

SUPPORTING INFORMATION

- SUPPLEMENTARY FIGURE 13.** Validation of deletion and complementation by PCR analyses of genomic DNA of *Penicillium expansum* wild-type NRRL 35695 (WT), null mutant *PeΔlaeA*, and complemented *PeΔlaeA:laeA* strains -----199
- SUPPLEMENTARY FIGURE 14.** Genome walking (GW) analyses of genomic DNA of *Penicillium expansum* wild type NRRL 35695 and null mutant *PeΔlaeA* strains -----200
- SUPPLEMENTARY FIGURE 15.** Validation of the mutant by quantitative real-time PCR analysis. -
-----202
- SUPPLEMENTARY FIGURE 16.** Rot growth rates obtained from Golden Delicious apples infected with *Penicillium expansum* wild type NRRL 35695, the null mutant *PeΔlaeA*, and the complemented *PeΔlaeA:laeA* strains -----203

Chapitre 3 : Résultats complémentaires : Analyse transcriptomique du mutant nul *PeΔveA*

- Figure 31.** Log₂ fold change (log₂FC) de l'expression des gènes appartenant aux clusters impliqués dans la biosynthèse de la patuline, de la citrinine et de la chaétoglobosine A chez les souches WT et *PeΔveA* -----212
- Figure 32.** Expression relative de 17 gènes codant pour d'autres enzymes ‘backbone’ (diméthylallyl tryptophane synthases (DMATS), terpène cyclases, synthétases de peptides non ribosomiques (NRPS), NRPS-like, polykétide synthases (PKS)) identifiés dans le génome de la souche *Penicillium expansum* d1 -----213

DISCUSSION GENERALE ET DISCUSSION

Figure 33. Diagramme de Venn montrant les gènes significativement sous-exprimés et surexprimés chez les souches mutantes *Pe Δ velB*, *Pe Δ laeA* et *Pe Δ veA* -----225

Figure 34. Log₂ fold change (log₂FC) de l'expression des gènes appartenant aux clusters impliqués dans la biosynthèse de la patuline, de la citrinine et de la chaétoglobosine A chez les souches *Pe Δ velB*, *Pe Δ laeA* et *Pe Δ veA* -----228

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

II. *Penicillium expansum*

Tableau 1. Les métabolites secondaires produits par <i>Penicillium expansum</i> -----	18
Tableau 2. Champignons filamenteux du genre <i>Penicillium</i> supposés produire de la patuline -----	21
Tableau 3. Champignons filamenteux supposés produire la citrinine -----	23
Tableau 4. Champignons du genre <i>Penicillium</i> supposés produire la roquefortine C -----	25
Tableau 5. Champignons du genre <i>Penicillium</i> supposés produire les andrastines -----	27

IV. Régulation du métabolisme secondaire chez les Aspergillaceae

Table 6. Examples of identified Zn (II) ₂ Cys ₆ and leucine zipper transcription factor (TF) involvement in secondary metabolism in fungi -----	60
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

TRAVAIL EXPERIMENTAL

Chapitre 1 : Implication de VelB dans le développement, la pathogénicité et le métabolisme secondaire chez *Penicillium expansum*

Table 7 Differential expressed genes (DEGs) involved in fungal development, conidiation, siderophore biosynthesis, nitrate assimilation, and ergosterol biosynthesis -----	108
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

SUPPORTING INFORMATION

SUPPLEMENTARY TABLE 1. Primers used for the construction and the validation of the deletion mutant PeΔvelB strain -----	116
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

SUPPLEMENTARY TABLE 2. Primers used to analyze the expression of genes involved in the citrinin, patulin, and chaetoglobosin clusters respectively -----	125
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

SUPPLEMENTARY TABLE 3. Secondary metabolites detected in ‘Golden Delicious’ apples infected with the null mutant PeΔvelB strain -----	133
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Chapitre 2 : Implication de *LaeA* dans le développement, la pathogénicité et le métabolisme secondaire chez *Penicillium expansum*

Table 8. Differential expressed genes (DEGs) involved in fungal development, conidiation, siderophore biosynthesis, nitrate assimilation, and ergosterol biosynthesis -----170

SUPPORTING INFORMATION

SUPPLEMENTARY TABLE 4. Primers used for the construction and the validation of the deletion mutant *PeΔlaeA* strain -----196

SUPPLEMENTARY TABLE 5. Fourteen orthologous genes similarly regulated to *wetA* in *Penicillium expansum ΔbrlA* and *P. rubens ΔbrlA* -----204

Chapitre 3 : Résultats complémentaires : Analyse transcriptomique du mutant nul *PeΔveA*

Table 9. Gènes différenciellement exprimés (DEG) impliqués dans le développement fongique, la conidiation, la biosynthèse des sidérophores, l'assimilation des nitrates et la biosynthèse de l'ergostérol chez la souche mutante nulle *PeΔveA* -----215

DISCUSSION GENERALE ET DISCUSSION

Table 10. Gènes différenciellement exprimés chez les trois souches mutantes *ΔvelB*, *ΔlaeA* et *ΔveA* et impliqués dans le métabolisme secondaire de *Penicillium expansum* -----232

Table 11. Gènes différenciellement exprimés chez les trois souches mutantes *ΔvelB*, *ΔlaeA* et *ΔveA* et impliqués dans le développement, la biosynthèse de sidérophores et de l'ergostérol et dans l'assimilation du nitrate -----239

LISTE DES ABREVIATIONS



LISTE DES ABREVIATIONS

A	
A.	<i>Aspergillus</i>
ACN	Acétonitrile
ANOVA	Analyse des variances
APAM	Milieu gélosé à base de purée de pommes
ATP	Adénosine triphosphate
a _w	Activité de l'eau
B	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CRP	Central Regulatory Pathway
C	
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
° C	Degré Celsius
cDNA	Acide Désoxyribonucléique Complémentaire
cm	Centimètre
CYA	Milieu gélosé à base d'extrait de levure (Czapeck Yeast extract Agar)
D	
DEG	Gènes Différentiellement Exprimés
DMAT	Diméthyl Allyl Transférase
dpi	Jour post-inoculation (Day Post Inoculation)
F	
F.	<i>Fusarium</i>
FT	Facteur de Transcription
H	
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
L	
LaeA	Loss of aflR Expression A
LC-HRMS	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse Haute Résolution
M	
mg/kg	Milligramme par kilogramme
µg/kg	Microgramme par kilogramme
MEA	Milieu gélosé à base d'extrait de malt (Malt Extract Agar)
N	
NLS	Séquence de localisation nucléaire (Nuclear Localization Sequence)
NRPS	Peptide Synthase Non Ribosomale
O	
OTA	Ochratoxine A
P	
P.	<i>Penicillium</i>
PAT	Patuline
pb	Paire de bases

PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Milieu gélosé à base de pommes de terre et de dextrose (Potato Dextrose Agar)
pH	Potentiel Hydrogène
PKS	Polycétide Synthase
PKS/NRPS	Hybride Polycétide Synthase - Peptide Synthase Non Ribosomale
Q	
qPCR	Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction
R	
RNA	Acide Ribonucléique (RiboNucleic acid)
RT-qPCR	Reverse Transcription- quantitative Polymerase Chain Reaction
S	
SEM	Erreur type de la moyenne (Standard Error of the Mean)
U	
UE/EU	Union Européenne/European Union
V	
VeA	Velvet A
VelB	Velvet-like B
VosA	Viability of spores A
VelC	Velvet-like C
W	
WT	Sauvage (Wild type)

INTRODUCTION



CONTEXTE DE L'ETUDE

Les champignons filamenteux revêtent une importance particulière pour les humains puisque certains peuvent leur être bénéfiques et d'autres se révéler nuisibles. Ils sont utilisés dans différents secteurs tels que celui de l'agro-alimentaire, de l'agro-pharmaceutique ou de la cosmétique. Néanmoins, certaines moisissures peuvent constituer une menace pour l'industrie alimentaire et fourragère en raison de la contamination par des composés bioactifs appelés mycotoxines, qui sont nocifs pour l'Homme et l'animal. Le terme "mycotoxine" vient de la combinaison du mot grec "mycos", qui fait référence à un champignon et du mot latin "toxicum" qui signifie poison (Jouany et al. 2009 ; Rai et al., 2012). Les mycotoxines sont des métabolites secondaires (ou spécialisés) de faible poids moléculaire (<1 000 daltons) produits par les champignons filamenteux (Marin et al., 2013). Les pertes alimentaires dues à la contamination par les mycotoxines représentent de 60 à 80% des aliments avariés, entraînant d'importantes pertes économiques dans le monde entier (Eskola et al., 2019).

Les métabolites secondaires ne sont pas essentiels au cycle de vie du champignon, mais ils peuvent leur conférer certains avantages compétitifs (Keller, 2019; Rai et al., 2012; Moss, 1991 ;). Parmi eux, 300 à 400 composés ont été reconnus comme des mycotoxines, dont les principaux producteurs appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Byssoschlamys* et *Claviceps* (Bryden, 2012). Les mycotoxines les plus communément étudiées en raison de leur toxicité sont les aflatoxines produites par les espèces d'*Aspergillus*, les ochratoxines produites par certaines espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*, les fumonisines, les trichothécènes et la zéaralénone produites par les espèces de *Fusarium*, et la patuline produite par plusieurs espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Paecilomyces* (Marin et al., 2013). L'énorme diversité structurelle des mycotoxines, leurs innombrables effets biologiques et leurs différents producteurs fongiques rendent leur classification difficile (Bennett and Klich, 2003). Les mycotoxines peuvent être à l'origine de

divers effets toxiques selon la toxine produite (seule ou en combinaison), sa structure, la dose et la durée d'exposition.

Elles peuvent induire une toxicité dans différents organes et ont divers mécanismes d'action cellulaires et moléculaires. Les teneurs maximales en aflatoxines (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 et AFM1), ochratoxine A, déoxynivalénol, fumonisines (FB1, FB2), toxine T-2, toxine HT-2, zéaralénone et patuline sont fixées par le règlement (CE) n° 1881/2006 de la Commission européenne et ses amendements.

La production de métabolites secondaires par les champignons filamenteux subit deux types de régulations : une régulation dite spécifique et une autre dite globale. Etant donné que les gènes impliqués dans la biosynthèse des métabolites secondaires sont organisés en cluster, la régulation spécifique se fait par le biais de facteurs de transcription spécifiques codés par des gènes localisés à l'intérieur du cluster biosynthétique. Ces facteurs de transcription spécifiques sont eux-mêmes contrôlés par des facteurs de transcription globaux, localisés à l'extérieur du cluster biosynthétique et répondant à de nombreux facteurs biotiques et abiotiques.

Trois facteurs de transcription globaux importants : VeA et VelB, deux protéines de la famille velvet et LaeA, une méthyltransférase, font partie d'un complexe dénommé le complexe velvet, régulé par la lumière, qui coordonne plusieurs processus physiologiques avec le métabolisme secondaire chez diverses espèces fongiques.

Le principal problème rencontré avec les champignons filamenteux réside dans le fait qu'ils sont capables de produire de nombreux métabolites secondaires parmi lesquels peuvent se trouver des mycotoxines inconnues, qui pourraient contaminer les matières premières et se montrer encore plus toxiques pour l'homme. Pour cette raison, il y a intérêt croissant pour la compréhension des conditions qui sont favorables pour la production de ces substances toxiques ainsi que des mécanismes de leur régulation.

Pour cette raison, l'objectif de cette thèse était de déterminer et de caractériser la régulation du développement, de la pathogénicité et du métabolisme secondaire de *P. expansum* par ces trois facteurs de transcription fortement conservés chez les champignons filamenteux.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

L'étude bibliographique qui suit est composée de quatre parties. Dans une première partie sont exposées les données générales concernant les moisissures et les mycotoxines. Dans une seconde partie une attention particulière est portée au champignon phytopathogène *Penicillium expansum* : sa classification, ses caractéristiques, les métabolites secondaires qu'il produit ainsi que leurs voies de biosynthèse, et finalement sa pathogénicité et les stratégies disponibles pour son contrôle. Dans une troisième partie est présentée la reproduction chez les champignons filamenteux et plus particulièrement chez les genres *Aspergillus* et *Penicillium*, ainsi que la régulation de cette reproduction par deux facteurs de transcription globaux, VelB et LaeA. Enfin, dans une quatrième et dernière partie, est présentée la régulation des voies de biosynthèses des mycotoxines par des facteurs de transcriptions spécifiques ou par des facteurs de transcriptions globaux répondant à des stimuli abiotiques. Cette étude bibliographique se termine par la présentation du complexe velvet, composé des trois protéines VeA, VelB et LaeA, et de son rôle clé chez différentes espèces de champignons filamenteux.

I. Moisissures, métabolites secondaires et mycotoxines

I.1. Les moisissures

Les champignons, ou mycètes, sont des organismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires. Pendant longtemps, ils ont été classés dans le règne végétal et ainsi enseignés dans les cours de botanique. Cependant, comme ces organismes possèdent des parois cellulaires renfermant de la chitine et qu'ils sont incapables de produire leurs propres matières organiques en raison de l'absence de chlorophylle, cette classification a changé. Ils ont alors été classés dans un nouveau règne, indépendant du règne végétal, connu sous le nom du 'règne des mycètes' (Berger et Guss, 2005). L'avènement de la biologie moléculaire a permis de montrer que les champignons étaient en réalité plus proches du règne animal que du règne végétal (Torruella et al., 2015).

Le règne fongique est l'un des règnes les plus importants sur terre et joue des rôles primordiaux dans de nombreux écosystèmes (Mueller et Schmit, 2007). Ce règne comporte des espèces macroscopiques (macromycètes) et des espèces microscopiques (micromycètes). Les micromycètes sont des microorganismes ubiquitaires, invisibles à l'œil nu (Tabuc, 2007), qui se développent aussi bien dans les environnements intérieurs qu'extérieurs (Muro-Cach et al., 2004). Le développement de ces espèces dépend de différentes conditions physico-chimiques, entre autres l'humidité, la température et la présence de substrats organiques et inorganiques (Aydogdu et Güçer, 2009). Les espèces appartenant au règne fongique ont différents modes de vie : on distingue les espèces saprophytes (qui décomposent l'écosystème et interviennent ainsi dans le processus de recyclage de carbone et d'azote), les espèces pathogènes (qui affectent les animaux et les humains en causant des maladies et des mycoses) (Lutzoni et al., 2004) et les espèces symbiotiques (comme les champignons mycorhiziens, les lichens, les endophytes) (Gargas et al., 1995). La classification des champignons a été entièrement revue. En effet, le taxon « champignon » est devenu ambigu et considéré obsolète car il ne désigne pas un groupe monophylétique mais plusieurs taxons distincts. Il a été divisé en eumycètes (Eumycota), oomycètes (Oomycota), microsporidies (Microsporidia) et mycétozoaires (Mycetozoa). Le sous-règne des eumycètes comprend maintenant les Ascomycota, les Basidiomycota, les Zygomycota et les Chytridiomycota et fait partie des opisthocontes (Opisthokonta) au même titre que les animaux dont ils sont les plus proches parents au niveau phylogénétique (Torruella et al., 2015). Les Oomycota sont des hétérocontes et se rapprochent de multiples groupes d'organismes unicellulaires et d'algues brunes. Les Microsporidia sont également des opisthocontes quoique différents des précédents. Les Mycetozoa sont classés dans les Amoebozoa.

I.2. Les champignons filamenteux et leurs métabolites secondaires

Les champignons filamenteux sont d'une grande importance pour l'Homme, d'une manière bénéfique ou nuisible, entraînant ainsi des conséquences économiques. Ils interviennent dans de nombreux secteurs, parmi lesquels les secteurs agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique, et médical.

Au sein de l'industrie alimentaire, certaines moisissures sont employées en vue de la production de certains fromages, tels que le roquefort (*Penicillium roqueforti*) (Coton et al., 2020) ou le camembert (*P. camembertii*) (Ropars et al., 2012). Elles peuvent également être employées pour la production de certains acides organiques, comme l'acide citrique, l'acide itaconique ou l'acide gluconique (*Aspergillus niger*) employés en tant qu'additifs alimentaires (Karaffa et al., 2001). Certaines moisissures sont utilisées pour la synthèse/production d'enzymes comme la maltase et la dextrinase. Ces enzymes transforment l'amidon et les dextrines en maltose et glucose, molécules qui pourraient être prises en charge lors de la fermentation alcoolique (*Rhizopus oryzae*). Ce processus de fermentation alcoolique est important pour la fabrication de l'alcool de riz en Asie (Lv et al., 2012). Dans l'industrie pharmaceutique, certaines moisissures sont utilisées pour la synthèse d'antibiotiques tels que la pénicilline (*P. chrysogenum*) ou la céphalosporine (*Cephalosporium acremonium*).

Ainsi, les champignons filamenteux présentent un intérêt industriel. Néanmoins, ils représentent une menace au sein du secteur de l'alimentation animale et humaine en raison de leur capacité à contaminer les denrées alimentaires. La prolifération des moisissures, pathogènes ou non, dégrade les denrées alimentaires et engendre des modifications défavorables dans leurs propriétés diététiques et organoleptiques (apparence, odeur, goût et texture). Ceci amène à des pertes économiques importantes.

En plus, la prolifération des moisissures peut mener à une diminution de la sécurité alimentaire et une augmentation des risques vis-à-vis la santé des consommateurs. En effet, en plus des métabolites secondaires (aussi appelés métabolites spécialisés) bénéfiques, les moisissures peuvent produire des métabolites toxiques : les mycotoxines. Les pertes de denrées alimentaires dues à la contamination par les mycotoxines représentent plus de 25 % de l'ensemble des aliments avariés (Egmond et al., 2004). En outre, une espèce de champignon filamenteux peut produire une ou plusieurs mycotoxines, et une même mycotoxine peut être produite par différentes espèces de moisissures. Ces mycotoxines peuvent être générées pré- ou post-récolte.

I.3. Les mycotoxines

I.3.1. Définition et généralités

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire (inférieur à 1000 Dalton), qui sont produites par plusieurs champignons filamenteux appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Byssochlamys* et *Claviceps* (Bryden, 2012 ; Marin et al., 2013). Ces métabolites ne sont pas nécessaires pour la croissance et le développement du champignon (Moss, 1991) mais donne plutôt des avantages concurrentiels à l'espèce productrice (Fox et Howlett, 2008).

Actuellement, entre 300 et 400 mycotoxines ont été isolées et caractérisées. A ce jour, seules les teneurs de six familles de mycotoxines sont réglementées pour l'Union européenne (règlement (CE) n° 1881/2006). Les mycotoxines les plus couramment retrouvées sont les aflatoxines (produites par des espèces appartenant au genre *Aspergillus*), les ochratoxines (OTA, produites par certaines espèces appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*), les fumonisines, les trichothécènes et la zéaralénone (ZEN, produites toutes par des espèces appartenant au genre *Fusarium*) et la patuline (produite par des espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Paecilomyces*) (Marin et al., 2013). D'autres mycotoxines ont attiré l'attention durant ces dernières années mais des études supplémentaires doivent être encore réalisées sur ces dernières pour évaluer leur toxicité et leurs caractéristiques. Parmi ces mycotoxines, on trouve entre autres la citrinine, la fusaproliférine, la moniliformine et la beauvéricine. La production de mycotoxines par les champignons filamenteux dépend de plusieurs facteurs tels que (1) la souche fongique, (2) la composition des denrées alimentaires, (3) les conditions environnementales, (4) les facteurs climatiques, (5) les pratiques de manipulation telles que les pratiques post-récolte, le transport, le stockage et les processus de transformation. La majorité des mycotoxines sont résistantes aux traitements chimiques, physiques et thermiques. Ceci signifie que ces molécules ne sont pas détruites par les processus simples de traitement alimentaire tels que la cuisson, l'ébullition, la friture, le rôtissage et la pasteurisation (Marin et al., 2013 ; Moretti et al., 2017). Ainsi, la contamination des aliments par les mycotoxines reste un problème mondial non résolu et un risque majeur pour la sécurité alimentaire.

I.3.2. Effets toxiques

Les mycotoxines constituent une menace majeure pour la santé humaine et animale. Lorsque ces substances toxiques sont ingérées, ou parfois inhalées, plusieurs effets toxiques peuvent être engendrés. Ceci dépend de la toxine en question, de la dose, de la durée d'exposition et de la personne exposée. Ces molécules peuvent induire une toxicité au niveau

de différents organes ; elles ont des mécanismes d'action cellulaires et moléculaires variés. Les mycotoxines peuvent être à l'origine d'une toxicité aiguë ou chronique. La toxicité aiguë survient lorsque le corps humain est exposé à des doses élevées de mycotoxines et les symptômes immédiats peuvent varier et incluent principalement des douleurs abdominales, des diarrhées, des perturbations gastrointestinales et des vomissements. Lorsque le corps est exposé à de faibles doses de mycotoxines pendant une longue période de temps, des déficiences graves peuvent se développer dans le foie, les reins et les organes du système immunitaire. Les effets toxiques des mycotoxines majeures sont présentés dans le tableau 1. Les aflatoxines B1, B2, G1, G2 et M1 sont considérées comme les mycotoxines les plus nocives à cause de leurs propriétés génotoxiques et cancérigènes.

Le fait que divers champignons filamenteux producteurs d'une ou de plusieurs mycotoxines ayant la capacité de contaminer chaque matière première constitue le principal problème auquel nous sommes confrontés. En plus, la majorité des denrées alimentaires est composée de différentes matières premières. Ceci étant dit, les animaux et les humains sont alors exposés non seulement à une, mais plutôt à un mélange de plusieurs mycotoxines. Une étude réalisée par Streit et al. (2013) a montré que sur 17 316 échantillons de denrées alimentaires testés, 38 % étaient contaminées par différentes mycotoxines simultanément. De nombreuses études ont montré que l'interaction entre plusieurs mycotoxines présentes dans un produit peut conduire à une toxicité plus importante que la toxicité de chaque mycotoxine individuelle (Smith et al., 1997; Speijers et Speijers, 2004). En particulier, une étude réalisée par Alassane-Kpembé et al. (2017) a montré que l'exposition simultanée à plusieurs mycotoxines peut aboutir à des effets synergiques (interaction entraînant un effet plus important que prévu), additifs (pas d'interaction, c'est-à-dire comme prévu) ou antagonistes (interaction entraînant un effet moins important que prévu). A titre d'exemple, des mélanges binaires ou ternaires de trichothécènes de type B (déoxynivalénol ou DON, nivalénol et leurs dérivés acétylés) ont révélé une cytotoxicité synergique à de faibles concentrations de mycotoxines et un effet additif ou presque additif à des concentrations plus élevées de mycotoxines (Alassane-Kpembé et al., 2013).

I.3.3. Réglementations

Des réglementations existent et des niveaux maximaux de contamination ont été fixés pour certaines mycotoxines dans les denrées alimentaires. Cependant, ces législations ne prennent pas en compte la possibilité de contaminations simultanées des denrées alimentaires par plusieurs mycotoxines. De plus, parmi toutes les mycotoxines décrites, uniquement trente

ont des effets toxiques avérés et moins d'un tiers d'entre elles sont réglementées. Les teneurs maximales en aflatoxines (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 et AFM1), en OTA, en DON, en fumonisines (FB1, FB2), en toxine T-2, en toxine HT-2, en zéaralénone (ZEA) et en patuline sont fixées par le règlement (CE) n° 1881/2006 de la Commission européenne et ses amendements. Un nombre limité de mycotoxines (à savoir les aflatoxines, le DON, la ZEN, les fumonisines et l'OTA) sont régulièrement testées dans le cadre du processus de fabrication des aliments pour animaux et font l'objet de réglementations/d'orientations fixées par la recommandation (CE) 576/2006 de la Commission et le règlement (UE) n° 165/2010 de la Commission. De plus, le règlement (UE) 2019/1901 de la Commission du 7 novembre 2019 a modifié le règlement (CE) n° 1881/2006 en ce qui concerne les teneurs maximales en citrinine des compléments alimentaires à base de riz fermenté avec la levure rouge *Monascus purpureus*. Les mycotoxines constituent un problème très important de santé publique, de qualité et de sécurité alimentaire et des recherches supplémentaires sur ce sujet sont encore nécessaires.

Dans la partie suivante de cette introduction, nous allons nous intéresser particulièrement à *Penicillium expansum* et à son métabolisme secondaire ou spécialisé.

II. *Penicillium expansum*

II. 1. Taxonomie et morphologie

Un petit groupe d'espèces pathogènes est apparu il y a 15 millions d'années (Figure 1) (Steenwyck et al., 2019) et comprend *Penicillium expansum* et deux espèces proches, *P. digitatum* et *P. italicum*, qui peuvent coloniser des fruits comme les pommes et les agrumes. *P. digitatum* et *P. italicum* sont des champignons nécrotrophes à l'origine de maladies post-récolte des agrumes connues sous le nom de « moisissure verte » et « moisissure bleue », respectivement, responsables de plus de 80 % de la pourriture des agrumes et pouvant cohabiter sur un même fruit. La présence de blessures à la surface du fruit est essentielle pour l'infection par ces champignons.

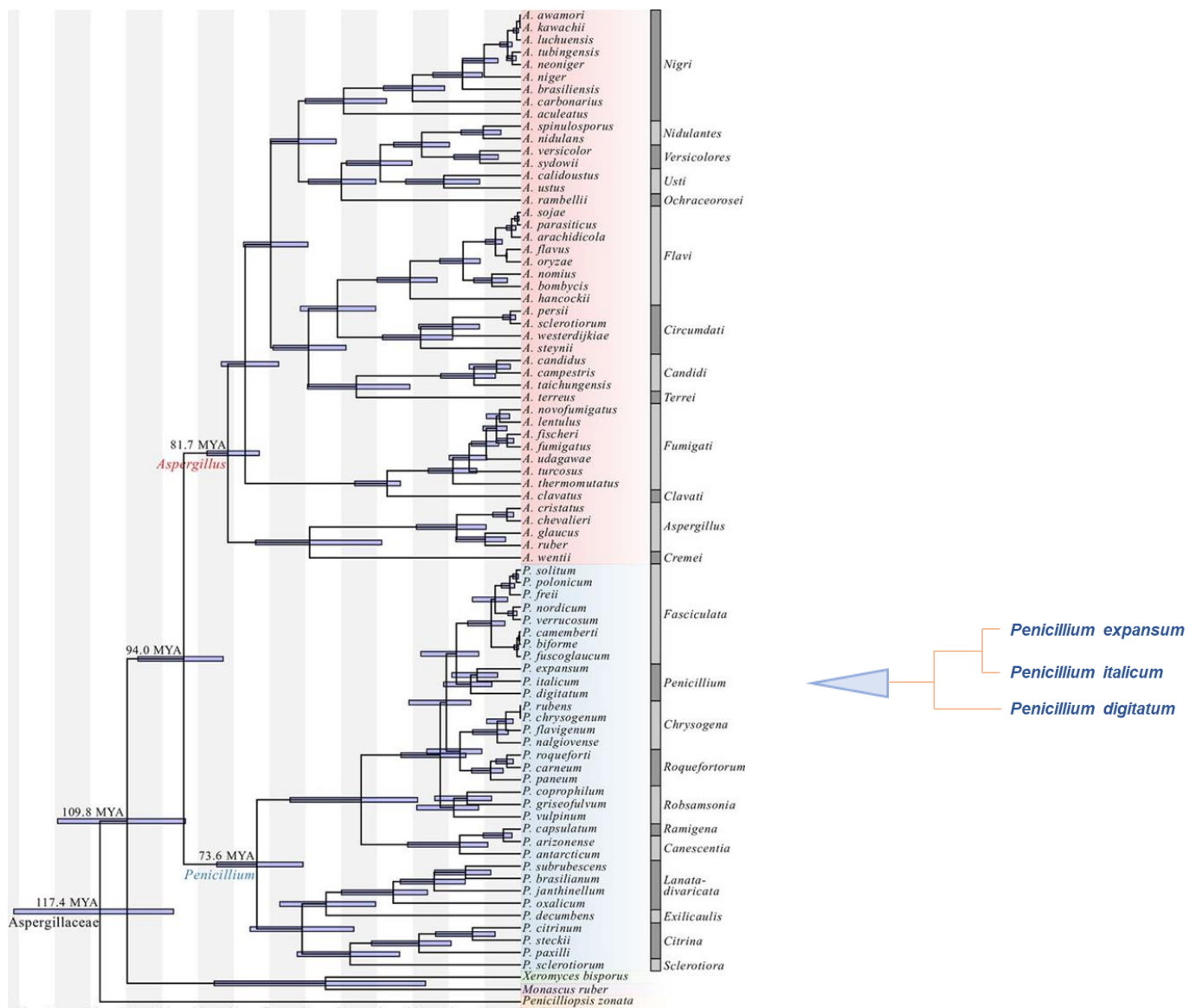


Figure 1. Arbre phylogénétique pour la famille des *Aspergillaceae* d'après Steewick et al. (2019).

P. expansum (Figure 2) est l'une des espèces les plus étudiées du genre *Penicillium* (Andersen et al., 2004a). Ce champignon appartient à la division *Ascomycota* (Ascomycètes), à la sous-division des *Pezizomycotina* à la classe des *Eurotiomycètes*, à la sous-classe des *Eurotiomycetidae*, à l'ordre des *Eurotiales*, à la famille des *Aspergillaceae* et au genre *Penicillium* (Houbraken et al., 2020).

Pour l'identification de *P. expansum*, on se base généralement sur les caractéristiques morphologiques de ses conidiophores. Les conidiophores de *P. expansum* sont terverticillés ; autrement dit ils sont ramifiés et présentent des phialides portés par un deuxième ordre de branches (metulae), portés à leur tour par des rameaux. Ces derniers sont regroupés généralement en corémies (Frisvad et Samson, 2004). Microscopiquement, les critères qui permettent d'identifier *P. expansum* sont ses stipes droits ayant une paroi lisse, ses phialides allongées ayant une forme d'ampoule cylindrique et ses conidies ayant une paroi lisse et une couleur verte terne et une forme ellipsoïdale (Figure 2A) (Frisvad et Samson, 2004 ; Pitt et Hocking, 2009).

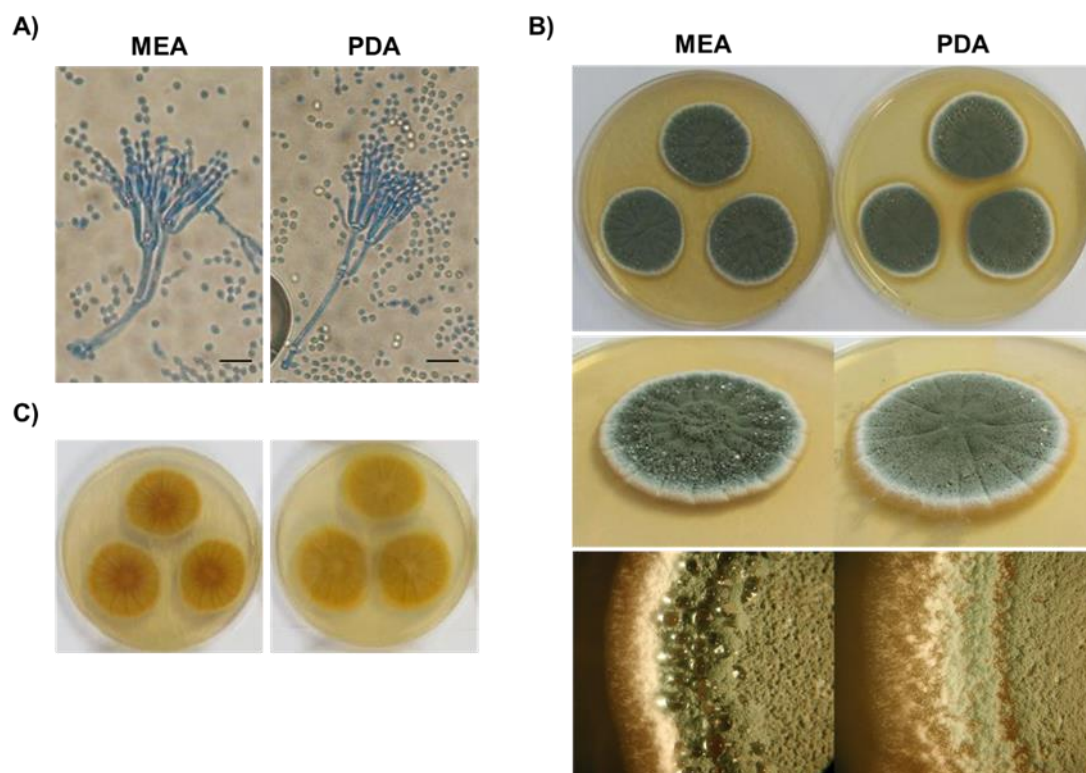


Figure 2. Apparence morphologique de *Penicillium expansum* NRRL 35695. A) Aspect macroscopique et observations sous un stéréomicroscope (x12) des colonies après 7 jours de culture à 25 °C à l'obscurité sur un milieu gélosé à base d'extrait de malt (MEA) et un milieu gélosé à base de pommes de terre (PDA). B) Aspect microscopique (x400) des conidiophores et des conidies après 7 jours de culture à 25 °C à l'obscurité sur MEA et PDA inoculé avec 10^4 spores. Les barres noires représentent 10 μ m.

En plus des caractéristiques morphologiques et microscopiques de ses conidiophores, *P. expansum* se distingue par des propriétés dites ‘macro-morphologiques’. Lorsque ce champignon est inoculé sur un milieu synthétique enrichi tel que le milieu gélosé à base d’extrait de malt (MEA) à 25 °C, des colonies de diamètre 40-50 mm se développent et présentent une texture veloutée et granuleuse avec une couleur bleu-vert dans les zones conidiennes et une marge externe blanche. Elles présentent également des sillons radiaux peu profonds avec de petites gouttes d'exsudat à la surface du mycélium (Figure 2B). L'envers de la colonie est pâle ou jaunâtre (Figure 2C).

II. 2. Caractéristiques biologiques, physiologiques et mode d’infection

P. expansum est un champignon psychrophile. Il est capable de se développer à des températures allant de -2 °C jusqu’à 35 °C. Sa croissance est optimale à une température de 25 °C (Pitt et Hocking, 2009). Un pH acide (4,0 à 5,0), des faibles teneurs en O₂ et des taux élevés d’humidité relative ($a_w = 0,98$) sont nécessaires pour la croissance mycélienne et la germination des spores (Pitt et Hocking, 2009).

De plus, *P. expansum* est un champignon ubiquitaire retrouvé dans l’environnement naturel, principalement dans l’air et le sol. Il est capable d’infecter une grande variété de fruits, plus particulièrement les fruits à pépins (pomaceae) (poires, coings). Les pommes restent le principal hôte pour le développement de ce champignon ; il constitue l’agent principal de la maladie de pourriture bleue retrouvées dans ces fruits (Baert et al., 2007; Tannous et al., 2018). Par ailleurs, *P. expansum* peut également être retrouvé dans d’autres produits comme les cerises, les pêches, les prunes, les noix, les noisettes, les légumineuses, les céréales, ainsi que les substrats non consommables tels que les matériaux de construction qui contiennent de la cellulose (Andersen et al., 2004; Filtenborg et al., 1996; Moss, 2008; Tannous et al., 2018).

En outre, ce champignon est considéré comme un champignon nécrotrophe et pathogène capable d’envahir les tissus des fruits de façon agressive et ceci en tuant les cellules hôtes pour obtenir des nutriments (Vilanova et al., 2014). Ceci peut avoir lieu principalement après la récolte des fruits, ainsi que durant les processus de transformation et de stockage. Ainsi, *P. expansum* engendre de grandes pertes au niveau des fruits récoltés allant jusqu’à 10 % (Li et al., 2015).

P. expansum est un « parasite des plaies » ce qui signifie qu’il contamine les fruits par le biais de blessures causées par des insectes, des oiseaux, des conditions climatiques défavorables ou même des dommages physiques apportés aux fruits durant la récolte ou le transport (Al Riachy et al., 2021 ; Tannous et al., 2018). A partir de ces blessures, les spores ou les conidies

sont capables de pénétrer dans le fruit. La première étape de l'infection par ce champignon pathogène est la germination des spores. Par la suite, ces dernières se développent sous forme d'hyphes formant le mycélium qui envahit le mésocarpe. Lors du développement du mycélium, ce dernier produit des spores asexuées appelées conidies qui nécessitent la présence d'oxygène, d'un certain niveau d'humidité relative et d'une source de composés organiques métabolisés ; le tout retrouvé au niveau des blessures à la surface des pommes. Les trois étapes du cycle de vie asexué de *P. expansum* sont la germination des spores, le développement végétatif et la conidiation.

Les conidies de *P. expansum* peuvent pénétrer dans les cellules de l'hôte directement par les tubes germinatifs en croissance, envahir les tissus de la pomme en dégradant la paroi cellulaire interne et finalement détruire la structure cellulaire interne (Liu, 2016). Lorsque le fruit est complètement colonisé et la pulpe entièrement consommée, le champignon perce l'épiderme (partie externe du péricarpe recouvrant les fruits), donnant naissance à des milliers de spores lors de la reproduction asexuée. Les symptômes de la maladie de pourriture bleue incluent le développement de cercles concentriques lisses, brun clair, où les lésions s'étendent rapidement à la surface et à l'intérieur des tissus du fruit.

II.3. Métabolites secondaires produits par *Penicillium expansum*

En plus des critères morphologiques et physiologiques, le profil métabolique représente un critère utile et largement utilisé pour l'identification et la caractérisation de *P. expansum* (Frisvad et Filtenborg, 1983). Comme toute espèce fongique, le profil de métabolites secondaires produits est propre à *P. expansum*. Ce dernier synthétise en effet une grande variété de molécules bioactives connues sous le nom de métabolites secondaires. Ces molécules possèdent des structures différentes et diversifiées ce qui explique leur implication dans de nombreux processus physiologiques : ils jouent le rôle de facteurs de virulence, agents de pathogénicité, signaux de communication assurant la coexistence avec d'autres organismes ou même des facteurs de protection contre les stress abiotiques (Bills et Gloer, 2016; Calvo et al., 2002; Keller, 2019). Le tableau 1 représente les différents métabolites secondaires produits par *P. expansum* selon les données de la littérature.

Tableau 1. Les métabolites secondaires produits par *Penicillium expansum*.

<i>Métabolites secondaires</i>	<i>Classification</i>	<i>Formule moléculaire</i>	<i>Effets toxiques indésirables ou usage</i>	<i>Référence</i>
<i>N-ACETYLTRYPTAMINE</i>		C ₁₂ H ₁₄ NO ₂	Inhibiteur de la sérotonine	Kozlovskii et al., 2002
<i>ANDRASTINE A</i>	Terpènes	C ₂₈ H ₃₈ O ₇	Composé antitumoral, activité antitrypanosomale	Kim et al., 2016
<i>ANDRASTINE B</i>	Terpènes	C ₂₈ H ₃₈ O ₇	Composé antitumoral	Kim et al., 2016
<i>ANDRASTINE C</i>	Terpènes	C ₂₈ H ₃₈ O ₇	Composé antitumoral	Kim et al., 2016
<i>CHAETOGLOBOSINE A</i>	Hybride polycétide-peptides non ribosomaux	C ₃₂ H ₃₆ N ₂ O ₅	Cytotoxicité	Andersen et al., 2004 ; Larsen et al., 1998
<i>CITRININE</i>	Polycétide	C ₁₃ H ₁₄ O ₅	Génotoxique, immunotoxique, tératogène, cytotoxique	Andersen et al., 2004. Harwing et al. 1973
<i>CLAVICIPITIC ACID</i>	Peptides non ribosomaux	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₂		
<i>COMMUNESINE A</i>	Peptides non ribosomaux	C ₂₈ H ₃₂ N ₄ O ₂	Cytotoxique, activité insecticide	Andersen et al., 2004 ; Hayashi et al., 2004 ; Lin et al., 2015
<i>COMMUNESINE B</i>	Peptides non ribosomaux	C ₂₈ H ₃₆ N ₄ O ₂	Cytotoxique, neurotoxique, activité insecticide	Andersen et al., 2004 ; Hayashi et al., 2004 ; Lin et al., 2015
<i>COMMUNESINE C</i>	Peptides non ribosomaux	C ₃₁ H ₃₄ N ₄ O ₂	Cytotoxique, activité insecticide	Hayashi et al., 2004 ; Lin et al., 2015

<i>COMMUNESINE D</i>	Peptides non ribosomaux	$C_{32}H_{34}N_4O_3$	Activité insecticide	Hayashi et al., 2004
<i>COMMUNESINE E</i>	Peptides non ribosomaux	$C_{27}H_{30}N_4O_2$	Activité insecticide	Hayashi et al., 2004
<i>COMMUNESINE F</i>	Peptides non ribosomaux	$C_{28}H_{32}N_4O$	Activité insecticide	Kerzaon et al., 2009 ; Lin et al., 2015
<i>COMMUNESINE I</i>	Peptides non ribosomaux	$C_{26}H_{30}N_4O$	Activité insecticide	Lin et al., 2015
<i>COMMUNESINE K</i>	Peptides non ribosomaux	$C_{26}H_{30}N_4$	Activité insecticide	Kerzaon et al., 2009
<i>COM470</i>	Peptides non ribosomaux	$C_{28}H_{30}N_4O_3$		Kerzaon et al., 2009
<i>COM570</i>	Peptides non ribosomaux	$C_{33}H_{38}N_4O_5$		Kerzaon et al., 2009
<i>COM622</i>	Peptides non ribosomaux	$C_{37}H_{42}N_4O_5$		Kerzaon et al., 2009
<i>AURANTIOCLAVINE</i>	Hybride polycétide-peptides non ribosomaux	$C_{15}H_{18}N_2$		King et al., 1977
<i>EXPANSOLIDES A/B</i>	Terpènes	$C_{17}H_{22}O_5$		Andersen et al., 2004 ; Larsen et al., 1998 ; Massias et al., 1990
<i>EXPANSOLIDES C/D</i>	Terpènes	$C_{15}H_{20}O_4$		Ying et al. 2017
<i>FUMARYL-D, L-ALANINE</i>		$C_7H_9NO_5$	Antibiotique	Birkinshaw et al., 1942
<i>GEOSMINE</i>	Terpènes	$C_{12}H_{22}O$	Relativement non-toxique	Mattheis et Roberts, 1992
<i>PATULINE</i>	Polycétide	$C_7H_6O_4$	Génotoxique, immunotoxique, tératogène, cytotoxique, cardio-toxique	Andersen et al., 2004 ; Frisvad et Filtenborg, 1983 ; Harwing et al. 1973 ; Puel et al., 2010

<i>m</i> -HYDROXYBENZYL ALCOOL	Polycétide	C ₇ H ₈ O ₂		Andersen et al., 2004
GENTISYL ALCOOL	Polycétide	C ₇ H ₈ O ₃		Andersen et al., 2004
<i>E</i> -ASCLADIOL	Polycétide	C ₇ H ₈ O ₄	Non toxique	Snini et al., 2016
ROQUEFORTINE C	Peptides non ribosomaux	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₂	Neurotoxine faible, faible toxicité	Andersen et al., 2004 ; Frisvad et Filtenborg, 1983
ROQUEFORTINE D	Peptides non ribosomaux	C ₂₂ H ₂₅ N ₅ O ₂		Andersen et al., 2004 ; Frisvad et Filtenborg, 1983

II.3.1. Patuline

La patuline est une mycotoxine produite par une grande variété de champignons filamenteux appartenant aux genres *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Paecilomyces* et *Penicillium* (Tannous et al., 2018). Parmi ce dernier genre, on recense à ce jour 19 espèces productrices (Tableau 2) (Frisvad, 2018).

Tableau 2. Champignons filamenteux du genre *Penicillium* supposés produire de la patuline

Espèces	Références
<i>Penicillium antarcticum</i> (= <i>P. selandiae</i>)	Vansteelandt et al., 2012
<i>P. carneum</i> (= <i>P. roqueforti</i> var. <i>carneum</i>)	Boysen et al., 1996 ; Dombrink-Kurtzman, 2007 ; Nielsen et al., 2006
<i>P. clavigerum</i>	Dombrink-Kurtzman, 2007 ; Dombrink-Kurtzman et Blackburn, 2005 ; Svendsen et Frisvad, 1994
<i>P. compactum</i>	Houbraken et al., 2016
<i>P. concentricum</i>	Dombrink-Kurtzman, 2007 ; Frisvad et Samson, 2004 ; Frisvad et al., 2004
<i>P. coprobium</i>	Dombrink-Kurtzman et Blackburn, 2005; Frisvad et Samson, 2004; Frisvad et al., 2004; Frisvad et Filtenborg, 1989; Houbraken et al., 2016
<i>P. dipodomycicola</i> (= <i>P. griseofulvum</i> var. <i>dipodomycicola</i>)	Dombrink-Kurtzman, 2007; Frisvad and Samson, 2004; Frisvad et al., 2004, 1987; Houbraken et al., 2016; Luque et al., 2013
<i>P. expansum</i> (= <i>P. equinum</i> = <i>P. leucopus</i>)	Andersen et al., 2004; Casquete et al., 2017; Chunmei et al., 2013; Dombrink-Kurtzman, 2007; Dombrink-Kurtzman et Blackburn, 2005; Frisvad et Filtenborg, 1983; Harwig et al., 1973; Larsen et al., 1998; Okeke et al., 1993; Paster et al., 1995; Paterson, 2004; Sommer et al., 1974; Steiman et al., 1989; Welke et al., 2011
<i>P. formosanum</i>	Frisvad et al., 2004
<i>P. gladioli</i>	Dombrink-Kurtzman, 2007; Frisvad et Samson, 2004; Frisvad et al., 2004
<i>P. glandicola</i> (= <i>P. divergens</i> = <i>P. granulatum</i>)	Frisvad et Filtenborg, 1989; Houbraken et al., 2016; Paterson, 2004
<i>P. griseofulvum</i> (= <i>P. maltum</i> = <i>P. patulum</i> = <i>P. urticae</i>)	Chunmei et al., 2013; Dombrink-Kurtzman, 2007; Dombrink-Kurtzman et Blackburn, 2005; Frisvad et al., 1987; Frisvad et Filtenborg, 1989, 1983; Houbraken et al., 2016; Okeke et al., 1993; Paterson, 2004; Steiman et al., 1989; Welke et al., 2011
<i>P. marinum</i>	Frisvad et Samson, 2004; Frisvad et al., 2004
<i>P. novae-zeelandiae</i>	Burton, 1949 ; Frisvad et Filtenborg, 1990
<i>P. paneum</i> (= <i>P. roqueforti</i> chemotype II)	Boysen et al., 1996; Dombrink-Kurtzman, 2007; Frisvad et Samson, 2004; Nielsen et al., 2005
<i>P. psychrosexualis</i>	Houbraken et al., 2010
<i>P. samsonianum</i>	Houbraken et al., 2016
<i>P. sclerotigenum</i>	Dombrink-Kurtzman, 2007; Frisvad et al., 2004
<i>P. vulpinum</i>	Dombrink-Kurtzman, 2007; Frisvad et al., 2004; Houbraken et al., 2016; Ismaiel et Papenbrock, 2015; Ismaiel et al., 2016

Cependant, *P. expansum* reste le principal producteur de cette mycotoxine (Puel et al., 2010). La patuline a été isolée pour la première fois pendant les années 1940 (Stott et Bullerman, 1975). Etant donné l'implication de plusieurs groupes dans la codécouverte de ce composé, la patuline a historiquement connue plusieurs noms tels que clavacine, expansine, claviformine, clavatine et acide gigantesque (Moake et al., 2005). La patuline (4-hydroxy-4H-furo [3,2c] pyran-2[6H]-one) est une lactone insaturée toxique, de formule chimique $C_7H_6O_4$ et ayant une masse moléculaire de 154,12 g/mol (Moake et al., 2005). Elle est soluble dans l'eau et les solvants organiques (éthanol, méthanol, acétone, acétate d'éthyle, éther et chloroforme), mais insoluble dans le pentane et l'hexane. La température de fusion de la patuline est égale à 110 °C et son absorption maximale des UV (λ max) est de 275 nm. La patuline est un métabolite secondaire toxique, indétectable au goût ou à l'odorat, présent non seulement dans les pommes, mais également dans les produits dérivés (jus, compotes). Bien que la patuline soit détectée dans de nombreuses matrices alimentaires, les pommes restent les plus susceptibles à l'infection par *P. expansum* et constituent un milieu favorable à la production de patuline par ce dernier. Par ailleurs, la production de patuline par ce champignon ne se limite pas uniquement aux pommes, mais peut également toucher plusieurs fruits tels que les poires, les abricots, les pêches, les fraises, les myrtilles, les cerises et le raisin, mais toujours à un niveau plus faible que celui trouvé dans les pommes (Puel et al., 2010). Les traitements thermiques n'affectent pas la stabilité de cette mycotoxine et l'exposition à long terme aux produits contaminés par la patuline peut engendrer de graves troubles de la santé (Tannous et al., 2018). Cependant, la patuline est dégradée en produits non toxiques tels que l'ascladiol (Tannous et al., 2017) ou l'acide désoxypatulinique (Castoria et al., 2011; Pinedo et al., 2018) lors du processus de fermentation.

Initialement, la patuline était employée à des fins médicinales en raison de ses propriétés antibiotiques. Puis, il a été démontré que la consommation de ce composé pouvait engendrer divers effets délétères se traduisant par des convulsions, des inflammations intestinales, des ulcères, des vomissements, des œdèmes ainsi que des dommages gastro-intestinaux et rénaux. L'exposition chronique à la patuline peut être associée au développement de risques notamment de neurotoxicité, immunosuppression, cytotoxicité et tératogénicité (Glaser et Stopper, 2012 ; Pitt et Hocking, 2009 ; Puel et al., 2010). De plus, la patuline est classée dans le groupe 3 (non classifiable quant à sa cancérogénicité pour les humains) par l'IARC. Au vu de sa toxicité, les niveaux maximaux de patuline dans les denrées alimentaires sont régulés dans de nombreux pays, tels que les États-Unis, la Chine et l'Union Européenne. Le taux maximal de patuline est

fixé à 50 µg/kg pour les jus de fruits, 25 µg/kg pour les produits solides à base de pommes et 10µg/kg pour les produits à base de pommes destinés aux nourrissons (EC Commission Regulation, 2006).

II.3.2. Autres métabolites secondaires produits par *P. expansum*

P. expansum produit une grande variété de métabolites secondaires appartenant à différentes classes chimiques. Dans ce qui suit, les principaux métabolites synthétisés par ce champignon seront présentés et regroupés selon leur structure chimique.

II.3.2.1. Les polycétides

La citrinine

La citrinine est considérée comme la deuxième mycotoxine la plus importante produite par *P. expansum* en termes de quantité. Cette toxine, comme la patuline, appartient à la famille des polycétides, molécules issues de la condensation de sous-unités acétyle ou malonyle par des polycétides synthèses.

Cette mycotoxine a été décrite pour la première fois par Hetherington et Raistrick (1931). La structure de la citrinine a été élucidée dix-sept ans après sa découverte (Brown et al., 1948). *P. expansum* n'est pas le seul champignon producteur de citrinine (Tableau 3), puisque cette dernière est produite par diverses espèces fongiques appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Monascus*.

Tableau 3. Champignons filamenteux supposés produire la citrinine

	Espèces	Références
	<i>A. alabamensis</i>	Samson et al., 2011
	<i>A. allahabadii</i>	Samson et al., 2011
	<i>A. carneus</i>	Chien et al., 1977; Samson et al., 2011
<i>Aspergillus</i> section <i>terrei</i>	<i>A. floccosus</i>	Samson et al., 2011
	<i>A. hortai</i>	Samson et al., 2011
	<i>A. neoindicus</i>	Samson et al., 2011
	<i>A. niveus</i>	Samson et al., 2011
	<i>A. pseudoterreus</i>	Samson et al., 2011
	<i>P. christenseniae</i>	Houbraken et al., 2011
	<i>P. chrysosporium</i>	Houbraken et al., 2011
	<i>P. citrinum</i>	Houbraken et al., 2011
	<i>P. cosmopolitanum</i>	Houbraken et al., 2011
	<i>P. godlewskii</i>	Houbraken et al., 2011
	<i>P. gorlenkoanum</i>	Houbraken et al., 2011
	<i>P. hetheringtonii</i>	Houbraken et al., 2011
<i>Penicillium</i> section <i>citrina</i>	<i>P. manginii</i>	Houbraken et al., 2011
	<i>P. nothofagi</i>	Houbraken et al., 2011

	<i>P. pancosmium</i>	Houbraken et al., 2011
	<i>P. raphiae</i>	Houbraken et al., 2011
	<i>P. ubiquetum</i>	Houbraken et al., 2011
	<i>P. vancouverense</i>	Houbraken et al., 2011
	<i>P. waksmanii</i>	Houbraken et al., 2011
	<i>P. wellingtonense</i>	Houbraken et al., 2011
	<i>P. westlingii</i>	Houbraken et al., 2011
	<i>Monascus purpureus</i>	Blanc et al., 1995
	<i>M. ruber</i>	Blanc et al. 1995
Autres	<i>P. albocoremium</i>	Overy and Frisvad, 2003
	<i>P. radicicola</i>	Overy et Frisvad, 2003
	<i>P. verrucosum</i>	(Frisvad and Filtenborg, 1989; Pitt, 1987)

La citrinine est connue surtout pour ses propriétés antibactériennes et antifongiques, mais également pour ses effets anti androgéniques et neuroprotectrices probables. Cependant, la toxicité de la citrinine envers les mammifères reste très étudiée (de Oliveira Filho et al., 2017 ; Flajs et Peraica, 2009). Contrairement à la patuline, la citrinine n'est pas nécessaire à la colonisation des pommes ; elle a plutôt des fonctions de soutien accessoires et semble être davantage un facteur d'établissement au cours du processus de colonisation et de formation du mycélium aérien (Touhami et al., 2018). La citrinine est induite par le stress oxydatif et servirait de protection contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) des pommes infectées (Li et al., 2017).

II.3.2.2. Les peptides non ribosomiques

Les communésines

Les communésines sont des métabolites secondaires polycycliques produits par *P. expansum* et *P. marinum* (Frisvad et al., 2004) appartenant à la famille des alcaloïdes indoliques. Selon la nature des trois substituants en position N8, C10 et N1', la famille des communésines est constituée d'au moins onze dérivés (A-I) (Pompeo et al., 2019). Parmi ces dérivés, les communésines A et B ont été isolées à partir du mycélium d'une souche de *Penicillium* fixée sur une algue marine (Numata et al., 1993), alors que les communésines C, D, E et F ont été isolées de la souche japonaise de *P. expansum* Link MK-57 (Hayashi, 2005; Hayashi et al., 2004) et les communésines G et H de *P. rivulum* Frisvad (Dalsgaard et al., 2005). Ces différents dérivés possèdent une activité anti-insecticides contre les vers à soie (Hayashi et al., 2004). Parmi les différents dérivés, les communésines A et B présentent une activité cytotoxique modérée à puissante contre différentes lignées cellulaires (Numata et al., 1993). La communésine I, isolée de la souche *P. expansum* Y32 d'origine marine, ainsi que les analogues

A et B ont montré des effets cardiovasculaires chez le poisson zèbre (Fan et al., 2015). Par ailleurs, un grand nombre de nouveaux analogues des communésines a été identifiée chez une souche marine de *P. expansum* par ionisation par électronebulisation couplée à la spectrométrie de masse (SM) en tandem (ESI-MS/MS) et SM à haute résolution (HRMS) (Hoang et al., 2016; Kerzaon et al., 2009).

La roquefortine C

La roquefortine C est une mycotoxine appartenant à la famille des alcaloïdes indoliques et produite par de nombreuses espèces fongiques, en particulier celles appartenant au genre *Penicillium* (Tableau 4) (Martin et Liras, 2016).

Tableau 4. Champignons du genre *Penicillium* supposés produire la roquefortine C

Espèces	Références
<i>Penicillium albocoremium</i>	Frisvad et Filtenborg, 1989 ; Overy et Frisvad, 2003
<i>P. allii</i>	Frisvad et Filtenborg, 1989
<i>P. atramentosum</i>	Frisvad et Filtenborg, 1989
<i>P. aurantiogriseum</i>	Kozlovsky et al., 2003
<i>P. bissetii</i>	Visagie et al., 2016
<i>P. brevicompactum</i>	Solov'eva et al., 1995
<i>P. carneum</i>	Boysen et al., 1996
<i>P. chrysogenum</i>	El-banna et al., 1987 ; Frisvad and Filtenborg, 1989
<i>P. commune</i>	Wagener et al., 1980; Vinokurova et al., 2003
<i>P. concentricum</i>	Frisvad et Filtenborg, 1989
<i>P. confertum</i>	Frisvad et Filtenborg, 1989
<i>P. coprobium</i>	Frisvad et Filtenborg, 1989
<i>P. coprophilum</i>	Frisvad et Filtenborg, 1989
<i>P. crustosum (P. farinosum)</i>	Kozlovsky et al., 1981 ; Kyriakidis et al., 1981
<i>P. cyclopium</i>	Kozlovsky and Reshetilova, 1984
<i>P. expansum</i>	Frisvad and Filtenborg, 1983 ; Ohmomo et al., 1980
<i>P. flavigenum</i>	Banke et al., 1997
<i>P. fundyense</i>	Visagie et al., 2016
<i>P. glandicola (P. granulatum)</i>	Frisvad et Filtenborg, 1983 (Frisvad et Filtenborg, 1989)
<i>P. griseofulvum (P. urticae)</i>	Ohmomo et al, 1980 (Frisvad et Filtenborg, 1983)
<i>P. hirsutum (P. corymbiferum)</i>	Ohmomo et al., 1980 (Frisvad et Filtenborg, 1989)
<i>P. hordei</i>	Frisvad et Filtenborg, 1989
<i>P. marinum</i>	Frisvad et al., 2004
<i>P. melanoconidium</i>	Frisvad et Filtenborg, 1989
<i>P. paneum</i>	Boysen et al., 1996
<i>P. persicinum</i>	Frisvad et al., 2004
<i>P. puberulum</i>	Solov'eva et al., 1995
<i>P. raditicola</i>	Overy et Frisvad, 2003
<i>P. roqueforti</i>	Scott et al., 1976; Yamaguchi et al., 1991

<i>P. sclerotigenum</i>	Frisvad et Filtenborg, 1990
<i>P. tulipae</i>	Overy et Frisvad, 2003
<i>P. venetum</i>	Frisvad et Filtenborg, 1989
<i>P. verrucosum</i>	Kozlovsky et Reshetilova, 1987
<i>P. viridicatum</i>	Solov'eva et al., 1995
<i>P. vulpinum (P. claviforme)</i>	Frisvad et Filtenborg, 1983 ()

Elle a été isolée pour la première fois à partir d'une souche de *P. roqueforti* (Scott et Kennedy, 1976). Cette espèce est surtout connue mondialement pour son utilisation technologique pour la production et l'affinage du fromage à pâte persillée. La roquefortine C est un composé faiblement neurotoxique, possédant une activité antibactérienne, surtout contre les bactéries Gram positives (Coton et al., 2020; Kopp-Holtwiesche et Rehm, 1990). Une étude réalisée par Keblys et al. (2004) a montré que la roquefortine C est une mycotoxine peu toxique en comparaison d'autres mycotoxines telles que l'OTA, la patuline ou l'acide cyclopiazonique, avec une inhibition relative de la prolifération des lymphocytes de l'ordre de 1,5.

II.3.2.3. Les hybrides polycétides/peptides non ribosomaux

Les chaetoglobosines

Les chaetoglobosines sont des métabolites secondaires appartenant à la famille des alcaloïdes cytochalasanes. Ils sont des hybrides ayant à la fois les caractéristiques de polycétides et de peptides non ribosomaux. Plus d'une centaine de chaetoglobosines et leurs analogues ont été isolées et identifiées, principalement à partir du champignon *Chaetomium globosum*. De nombreuses études ont montrés que ces métabolites secondaires possèdent une grande variété d'activités biologiques telles que des activités antitumorale, antifongique, phytotoxique, fibrinolytique, antibactérienne, nématocide, anti-inflammatoire et anti-VIH (Chen et al., 2020).

Andersen et al. (2004) ont analysé 260 souches de *P. expansum* provenant de différents substrats et zones géographiques. Ils ont montré que *P. expansum* est l'un des plus importants producteurs des chaetoglobosines A et C. La présence de ces deux mycotoxines dans des pommes naturellement infectées par *P. expansum* a été confirmée lors de cette même étude. Cette coexistence des chaetoglobosines A et C peut se révéler mortelle vis-à-vis des cellules mammaliennes ; ces deux mycotoxines agissent en se liant à l'actine, engendrant ainsi une inhibition de la division cellulaire. Dans des études plus récentes, la cytotoxicité des chaetoglobosines A et C contre diverses lignées cellulaires humaines a été confirmée (Li et al., 2014 ; Thohinung et al., 2010 ; Zhang et al., 2010).

II.3.2.4. Les terpènes

Les andrastines

Les andrastines sont des composés partiellement terpéniques, les méroterpénoïdes, produits par de nombreux champignons appartenant au genre *Penicillium* (Tableau 5), et synthétisés à partir d'un terpène et d'un polycétide.

Tableau 5. Champignons du genre *Penicillium* supposés produire les andrastines

Espèces	Références
<i>Penicillium albocoremium</i>	Overy et al., 2005
<i>P. camponatum</i>	Visagie et al., 2016
<i>P. cataractum</i>	Visagie et al., 2016
<i>P. costaricense</i>	Visagie et al., 2016
<i>P. crustosum</i>	Sonjak et al., 2005
<i>P. infrabuccalum</i>	Visagie et al., 2016
<i>P. nucicola</i>	Visagie et al., 2016
<i>P. paneum</i>	O'Brien et al., 2006
<i>P. panissanguineum</i>	Visagie et al., 2016
<i>P. roqueforti</i>	Nielsen et al., 2005
<i>P. vulpinum</i>	Qin et al., 2022

Une grande variété d'andrastines a déjà été isolée (Geris et Simpson, 2009). Les activités biologiques de ces composés peuvent être regroupées en plusieurs domaines principaux : antimicrobiens, antiviraux, antitumoraux, immunomodulateurs, inhibiteurs et activateurs d'enzymes, phytotoxines, mycotoxines et anti-insectes (Geris et Simpson, 2009). *P. expansum* est capable de produire les andrastines A, B et C (Kim et al., 2012, 2016). L'andrastine A possède des activités biologiques intéressantes qui permettent de la classer parmi les composés antitumoraux prometteurs. En effet, elle est capable d'inhiber l'activité de la farnésyltransférase ce qui engendre une altération de la localisation membranaire et de l'activation des protéines RAS oncogènes (Omura et al., 1996).

La géosmine

La géosmine est un métabolite secondaire appartenant à la famille des terpènes. Ce composé est principalement responsable de l'odeur rance et terreuse associée à *P. expansum* (Mattheis et Roberts, 1992). Divers organismes, parmi lesquels des cyanobactéries et des champignons sont capables de produire ce métabolite secondaire (Izaguirre et al., 1982 ; La Guerche et al., 2005 ; Schöller et al., 2002). En 1996, Young et al. ont montré que la géosmine est relativement peu toxique pour les invertébrés et les mammifères. De même, la production de ce métabolite dans les biofilms n'a montré aucune toxicité (Blaha et al., 2004). Melo et al.

(2020) ont montré que la géosmine médiait la ponte des œufs chez le moustique de la fièvre jaune *Aedes aegypti*, qui associe la géosmine aux microbes présents dans l'habitat aquatique des larves. La géosmine pourrait être utilisée en tant qu'appât de pièges à moustiques (Melo et al., 2020).

Les expansolides

Les expansolides sont des molécules bioactives, qui, comme la géosmine, appartiennent à la famille des terpènes. Les expansolides A et B sont des sesquiterpènes lactones cycliques, identifiés pour la première fois chez le champignon phytopathogène *P. expansum* (Andersen et al., 2004; Massias et al., 1990) ainsi que les expansolides C et D (Ying et al., 2017). Ces métabolites secondaires sont trouvés dans les zones pourries des pommes (Watanabe, 2008) ainsi que dans le jus de cerise (Larsen et al., 1998). Au niveau de la toxicité de ces molécules, un mélange épimérique des expansolides C et D a présenté une activité inhibitrice α -glucosidase in vitro (Ying et al., 2017).

II.4. Voies de biosynthèse des métabolites secondaires produits par *P. expansum*

II.4.1. La biosynthèse de la patuline

La voie de biosynthèse de la patuline a été étudiée depuis les années 1950 mais reste toujours non entièrement élucidée (Figure 3A). Elle consiste au moins en 10 étapes enzymatiques (Artigot et al., 2009 ; Li et al., 2019, 2020 ; Puel et al., 2010; Tannous et al., 2018) :

1. Un acétyl-CoA et trois malonyl-CoA sont condensés grâce à l'action d'une polycétide synthase, enzyme multifonctionnelle appelée 6-méthylsalicylic synthase (MSAS) pour former l'acide 6-méthylsalicylique. Cette enzyme est codée par le gène *patK* (Beck et al., 1990)
2. L'acide 6-méthylsalicylique subit une décarboxylation par la 6-méthylsalicylique décarboxylase codée par le gène *patG* pour former le *m*-crésol (Snini et al., 2014).
3. Après, le groupement méthyle du *m*-crésol est oxydé en un groupement aldéhyde par le cytochrome P-450 CYP619C3 (*m*-crésol hydroxylase, PatH) pour ainsi donner le *m*-hydroxybenzyl alcool (Artigot et al., 2009).
4. Cette étape est suivie par une réaction d'hydroxylation catalysée par un autre cytochrome P450, le CYP619C2 (*m*-hydroxybenzyl hydroxylase PatI), qui engendre la formation de l'alcool gentisylique (Artigot et al., 2009). Le CYP619C2 catalyse également l'hydroxylation du *m*-crésol en toluquinol, un produit dérivé.
5. Conversion putative de l'alcool gentisylique en gentisaldéhyde.
6. L'étape suivante conduit à la formation de l'isoépoxydon.
7. Le gène *patN* (*idh*) code pour une enzyme, l'isoépoxydon déshydrogénase qui est responsable de la conversion de l'isoépoxydon en phyllostine (Fedeshko, 1992)
8. Conversion de la phyllostine en néopatuline. Cette réaction est catalysée par PatF (néopatuline synthase) (Fedeshko, 1992).
9. Conversion de la néopatuline en E-ascladiol grâce à une réduction NADPH - dépendante.
10. La dernière étape est réalisée par PatE, une glucose-méthanol-choline oxydoréductase, qui permet de convertir le E-ascladiol en patuline (Tannous et al., 2017).

Si la formation de la phyllostine à partir de l'isoépoxydon, catalysée par PatN, de la néopatuline à partir de la phyllostine, catalysée par PatF, et de la patuline à partir de l'E-ascladiol, catalysée par PatE, est consensuelle, les enzymes catalysant la transformation du gentisyl aldéhyde en isoépoxydon et de la néopatuline en E-ascladiol restent sujettes à

spéculation. Li et al (2019) ont suggéré l'intervention de PatJ et PatO pour la formation de l'isoépoxydon et de PatD pour celle de l'E-ascladiol. PatB, PatE, PatF et PatO ont été retrouvées dans les exsudats de *P. expansum* (Rocher et al., manuscrit soumis), ce qui est cohérent puisque ces quatre enzymes possèdent un peptide signal. Ces enzymes seraient donc situées à l'extérieur de la cellule fongique et certainement en aval des enzymes PatD, PatJ et PatN, qui ne possèdent pas de peptide signal. Dans le groupe de gènes codant pour la biosynthèse de l'acide terréique, un isomère de la phyllostine, il n'y a pas d'équivalent de patB et patO (Guo et al 2014 ; Yin et al 2016), ce qui suggère que PatB et PatO sont en aval de la biosynthèse de la phyllostine. D'autant que la fonction putative de PatB est une carboxylestérase, c'est-à-dire une hydrolase des fonctions carboxyliques, et pourrait être impliquée dans la conversion de la néopatuline en E-ascladiol. PatD, une alcool déshydrogénase dépourvue de peptide signal, pourrait être impliquée en amont de la formation de l'isoépoxydon, par exemple dans la conversion de l'alcool gentisylrique en aldéhyde gentisylrique.

Comme pour la majorité des métabolites secondaires, les gènes impliqués dans la biosynthèse de la patuline sont groupés au sein d'un même cluster (Ballester et al., 2015 ; Li et al., 2015 ; Tannous et al., 2014). Le cluster de la patuline est composé de 15 gènes (PEXP_094320-PEXP_094460) (Figure 3B), qui sont répartis en trois catégories : les transporteurs, le facteur de transcription (FT) et les enzymes biosynthétiques (Ballester et al., 2015 ; Li et al., 2015 ; Tannous et al., 2014).

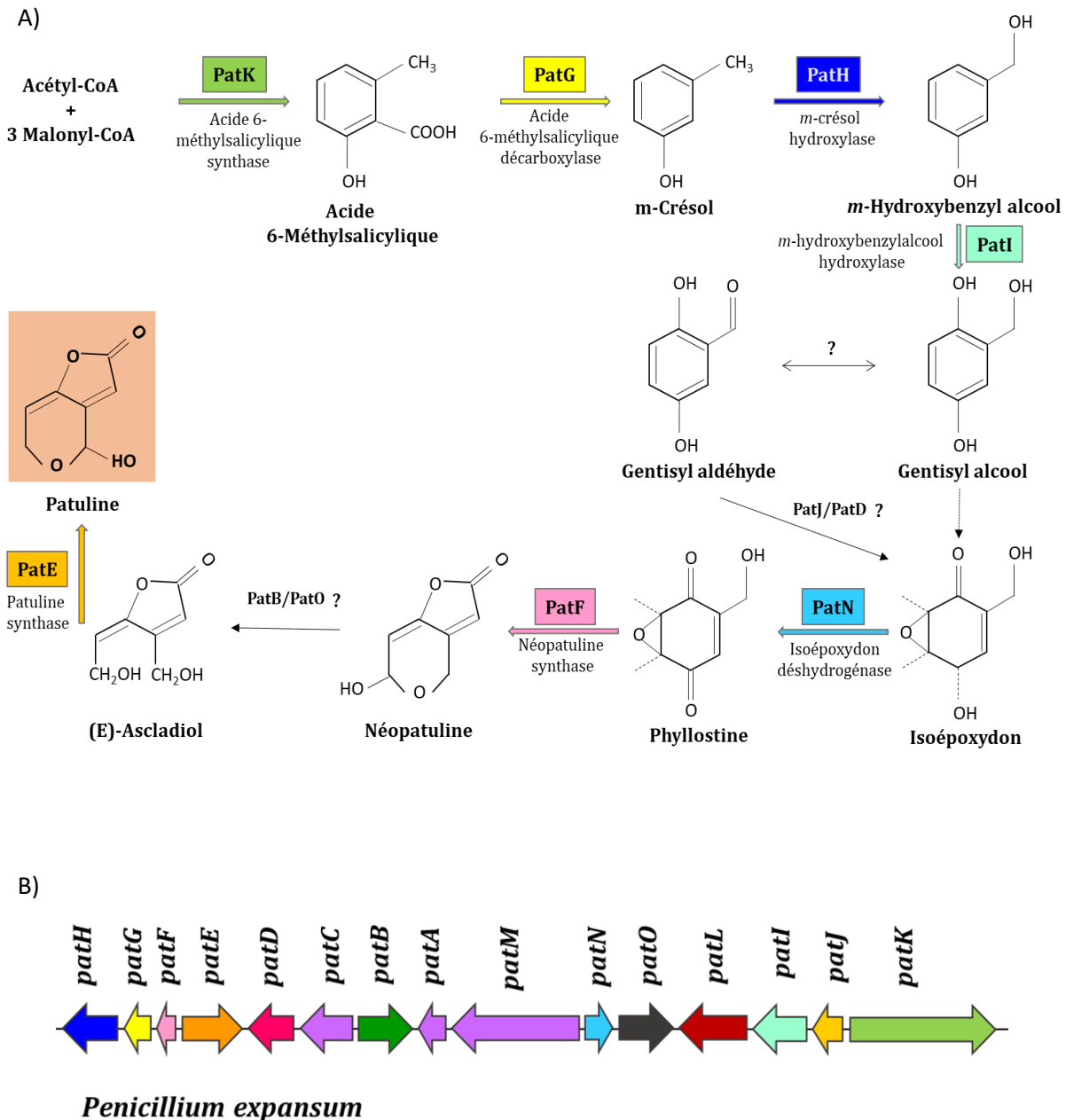


Figure 3. A) La voie de biosynthèse de la patuline (adaptée de Tannous et al., 2018). B) Représentation schématique du cluster de la patuline (15 gènes, 40 kb) chez *P. expansum*. Le sens de la transcription est indiqué par les pointes des flèches (Tannous et al., 2014).

Trois gènes codent pour des transporteurs, PatA, un membre de la famille des transporteurs d'acétate, PatC, un transporteur de la major facilitator superfamily (MFS) et PatM, un transporteur ATP-binding cassette (ABC). Le gène *patL* code pour un FT putatif localisé dans le noyau. Des études antérieures ont montré que le cluster de biosynthèse de la patuline est régulé et activé spécifiquement par PatL (PEXP_094430) (Ballester et al., 2015 ; Li et al., 2015 ; Snini et al., 2016). Onze gènes codent pour des enzymes biosynthétiques, PatB, PatD, PatF, PatG, PatK, et PatN, localisées dans le cytoplasme, patH et PatI, localisées dans le réticulum

endoplasmique, PatJ et PatO, localisées dans la vacuole et PatE, localisée au niveau de la paroi cellulaire (Li et al., 2019). La fonction de quatre gènes (*patB*, *patD*, *patO* et *patJ*) reste peu connue (Ballester et al., 2015 ; Li et al., 2015 ; Tannous et al., 2014).

La production de patuline est également positivement régulée par PacC et CreA, deux facteurs de transcription qui répondent à des stimuli abiotiques, plus particulièrement, le pH et la source de carbone, respectivement (Barad et al., 2016; Tannous et al., 2018b). LaeA (méthyltransférase) et VeA (membre de la famille velvet), deux composants du complexe velvet agissent comme régulateurs positifs de la biosynthèse de la patuline (El Hajj Assaf et al., 2018 ; Kumar et al., 2016). Tannous et al. (2018) ont montré que la délétion de *sntB*, un gène codant pour un lecteur épigénétique, engendre une diminution de la production de patuline *in vitro* et *in planta*.

II.4.2. La biosynthèse de la citrinine

La voie de biosynthèse de la citrinine (Figure 4) a été récemment élucidée chez une souche de *Monascus ruber*. Elle comporte les étapes suivantes (He et Cox, 2016) :

1. La première étape dans la voie de biosynthèse de la citrinine consiste en une condensation d'une unité d'acétyl-CoA et de trois unités de malonyl-CoA, ce qui permet la formation d'un pentacétide triméthylée non réduit. Cette étape est catalysée par une polycétide synthase non réductrice (nrPKS), qui n'est autre que CitS.
2. Cette étape est suivie d'une réaction d'hydrolyse catalysée par CitA, qui aboutit à la formation d'un cétoaldéhyde, le premier intermédiaire de cette voie de biosynthèse.
3. Par la suite, CitB, une oxydase à fer non hémique, catalyse l'oxydation du groupement méthyle du C12 en un groupement alcool.
4. La prochaine étape est catalysée par CitC, une oxydoréductase, qui oxyde le groupement alcool en position C12 en un groupement aldéhyde.
5. Ensuite, une aldéhyde déshydrogénase, CitD, convertit le groupement aldéhyde en position C12 en acide carboxylique.
6. Finalement, CitE catalyse une réaction de réduction en position C3 ce qui engendre la formation de la citrinine.

Le cluster de la citrinine a été découvert chez une souche de *M. purpureus* (Shimizu et al., 2007), et plus récemment, des clusters identiques ont été identifiés chez les espèces *M. ruber* (He et Cox, 2016), *M. aurantiacus* (Li et al., 2011), et *P. expansum* (A. Ballester et al., 2015). Le cluster de gènes présumé chez *P. expansum* comprend 9 gènes : *orf5* qui code pour un transporteur MFS, *citS* qui code pour une PKS, *citA* et *citB* qui codent pour une hydrolase et

une dioxygénase, respectivement, deux gènes codant pour les déshydrogénases CitE et CitD, *citC* qui code pour une oxydoréductase, *orf6* codant pour une glyoxalase et un gène codant pour le FT *ctnA*.

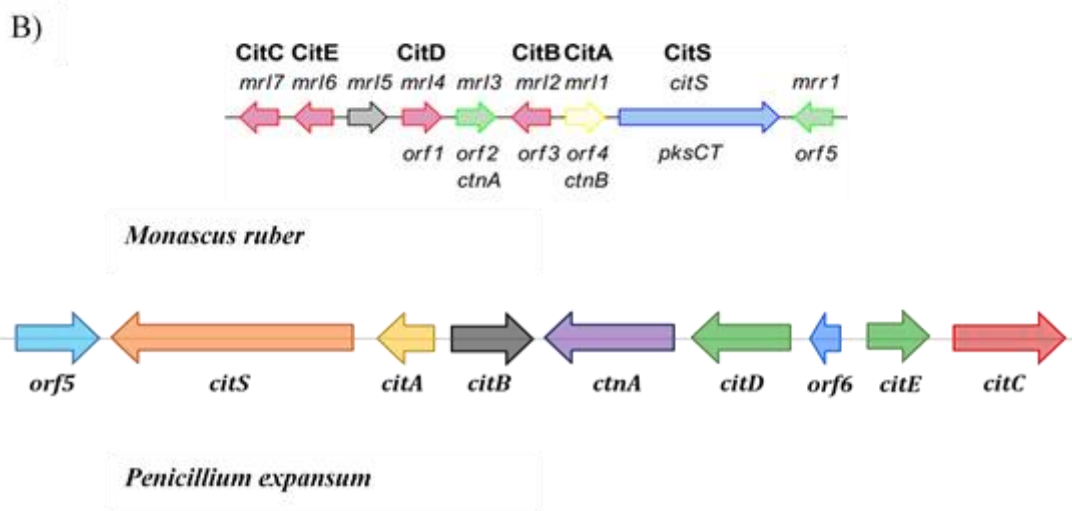
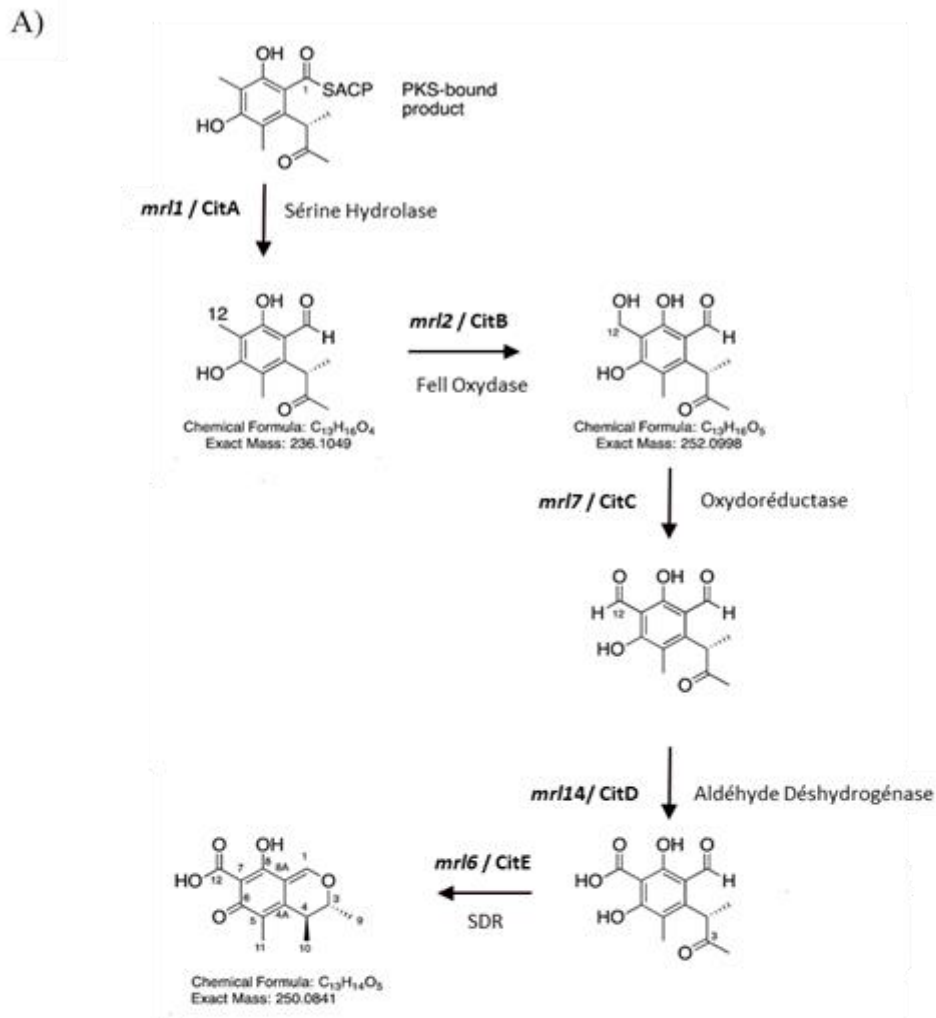
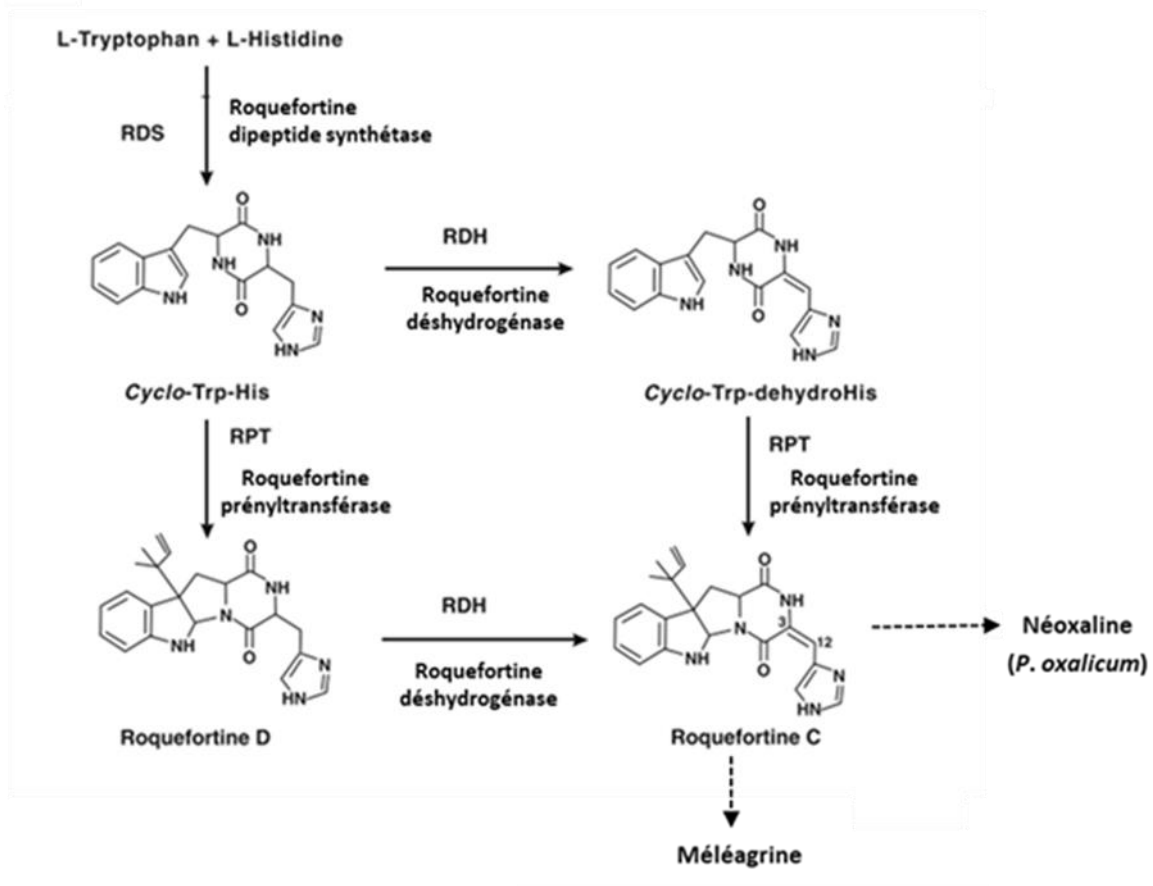


Figure 4. A) La voie de biosynthèse de la citrinine (He and Cox, 2016). B) Représentation schématique du cluster de la citrinine (9 gènes, 20 kb) chez *Monascus ruber* (He and Cox, 2016) et chez *Penicillium expansum* (Ballester et al. 2015). Les pointes de flèches indiquent la direction de la transcription.

II.4.3. La biosynthèse de la roquefortine C

Le cluster biosynthétique de la roquefortine C a été caractérisé pour la première fois chez *P. chrysogenum* (Ali et al., 2013; García-Estrada et al., 2011; Ries et al., 2013) puis chez *P. roqueforti* (Kosalková et al., 2015). Récemment, il a été identifié chez *P. expansum* (Martín et Liras, 2016) et chez *P. griseofulvum* (Banani et al., 2016). Cependant, le nombre de gènes impliqués dans la biosynthèse de ce métabolite est inférieur chez *P. expansum* à celui dans d'autres espèces productrices de roquefortine C telles que *P. oxalicum* ou *P. chrysogenum* (Banani et al., 2016). La biosynthèse de la roquefortine C provient de la condensation des acides aminés L-tryptophane et L-histidine, une réaction qui favorise la formation d'un cyclopeptide de tryptophane-histidine contenant un cycle dicétopipérazine. Cette réaction est catalysée par la roquefortine dipeptide synthase (RDS) (Figure 5) codée par le gène *roqA* (Martín et Liras, 2016). Les dernières réactions de cette voie de biosynthèse convertissent le squelette de type roquefortine en composés différents, la méléagrine, les glandicolines A et B ou la néoxaline, suite à la réorganisation du squelette carboné. Cependant, ces composés ne sont pas détectés chez *P. expansum*. En effet, le cluster de la roquefortine C/méléagrine n'est que partiellement conservé chez *P. expansum* et ne comporte qu'un cluster de trois gènes fonctionnels contenant les trois gènes (*rds* ou *roqA*, *rdh* ou *roqD* codant pour la roquefortine D déshydrogénase, *rpt* ou *roqR* codant pour la roquefortine prényltransférase) essentiels et nécessaires pour la biosynthèse de la roquefortine C en plus de trois pseudogènes dont (*roqT*) codant pour un transporteur MFS (Banani et al., 2016 ; Martín et Liras, 2016). *P. chrysogenum* (*P. rubens*) et *P. oxalicum* produisent respectivement la méléagrine et la néoxaline (Ali et al., 2013; Frisvad et Thale, 1993).

A)



B)

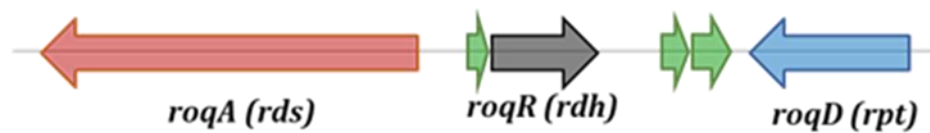


Figure 5. A) La voie de biosynthèse de la roquefortine C (Martin et Liras, 2015). B) Représentation schématique du cluster de la roquefortine C chez *P. expansum* (Banani et al., 2016 ; Martin et Liras, 2016). Les pointes des flèches indiquent le sens de la transcription.

II.4.4. La biosynthèse des communésines

La voie de biosynthèse des communésines a été décrite chez *P. expansum* (Figure 6) (Lin et al., 2015). Les communésines sont synthétisées suite à la condensation de la tryptamine et de l'aurantioclavine, deux éléments constitutifs dérivés du L-tryptophane. Le cluster des communésines comprend 16 gènes, parmi lesquels *cnsN* code pour un FT spécifique (Figure 6) (Lin et al., 2015).

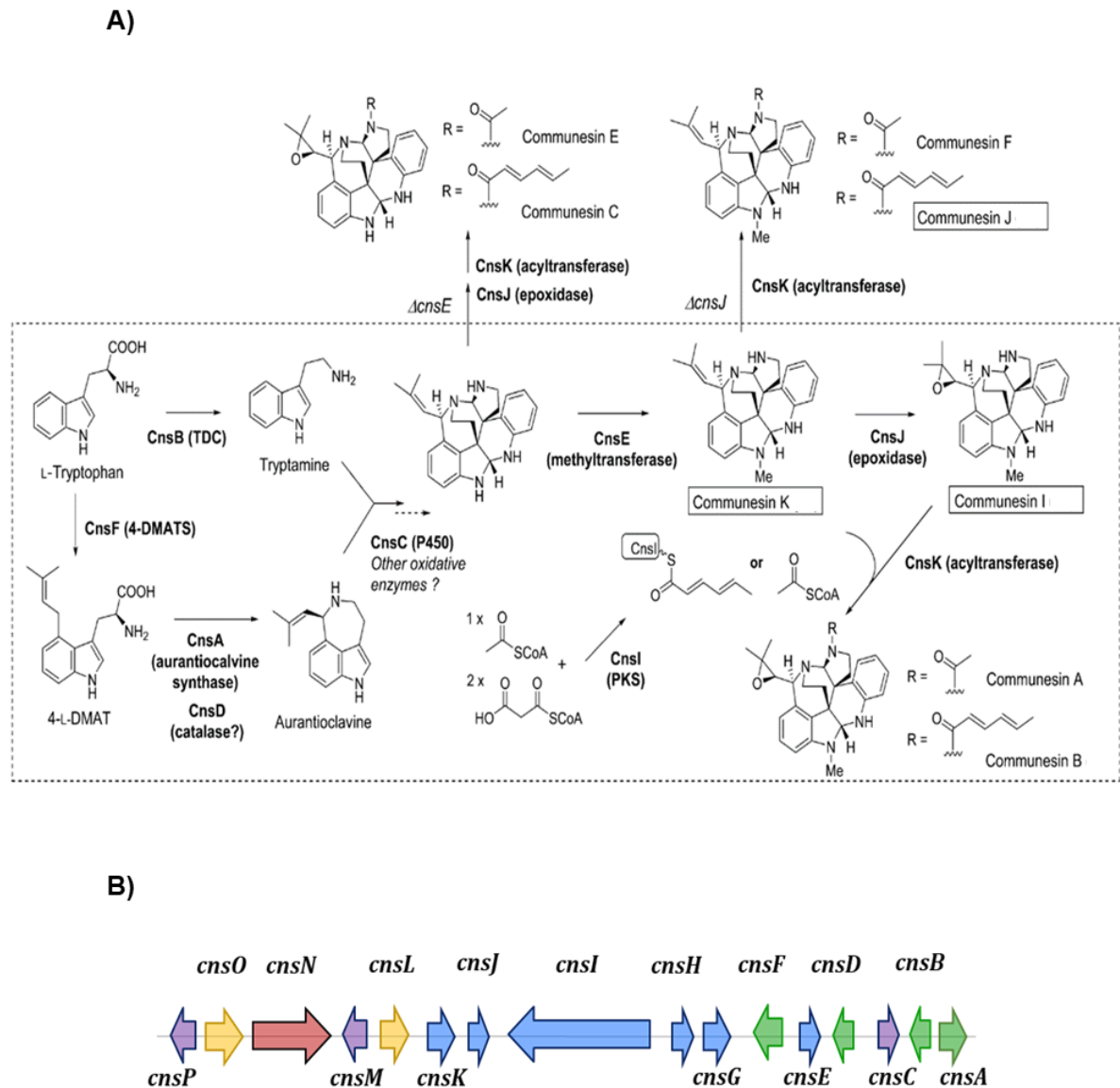


Figure 6. A) La voie de biosynthèse des communésines. La voie dans le rectangle en pointillés représente la voie principale menant à la biosynthèse des communésines A et B chez *P. expansum*. B) Représentation schématique du cluster des communésines chez *P. expansum* (Lin et al. 2015). Les pointes des flèches indiquent le sens de la transcription.

II.4.5. La biosynthèse des chaetoglobosines

P. expansum produit principalement les chaetoglobosines A et C. La biosynthèse de la chaetoglobosine A est catalysée par une protéine hybride, polycétide synthase-peptide non ribosomal synthétase. Les analogues de chaetoglobosines possèdent différents degrés d'oxydation introduits tout le long de la voie de biosynthèse (Ishiuchi et al., 2013).

Le cluster des gènes impliqués dans la biosynthèse des chaetoglobosines a été caractérisé pour la première fois chez *P. expansum* par Schümann et Hertweck (2007). Cependant, ce cluster n'a pas été retrouvé chez aucune des souches de *P. expansum* séquencée (A. Ballester et al., 2015; Clemmensen et al., 2022; Li et al., 2015).

Dans une étude plus récente, un cluster de 11 gènes impliqués dans la production de chaetoglobosines chez *P. expansum*, et présentant une forte similitude avec le cluster de chaetoglobosines décrit chez *Chaetomium globosum*, a été élucidé (Figure 7) (Zetina-Serrano et al., 2020a).

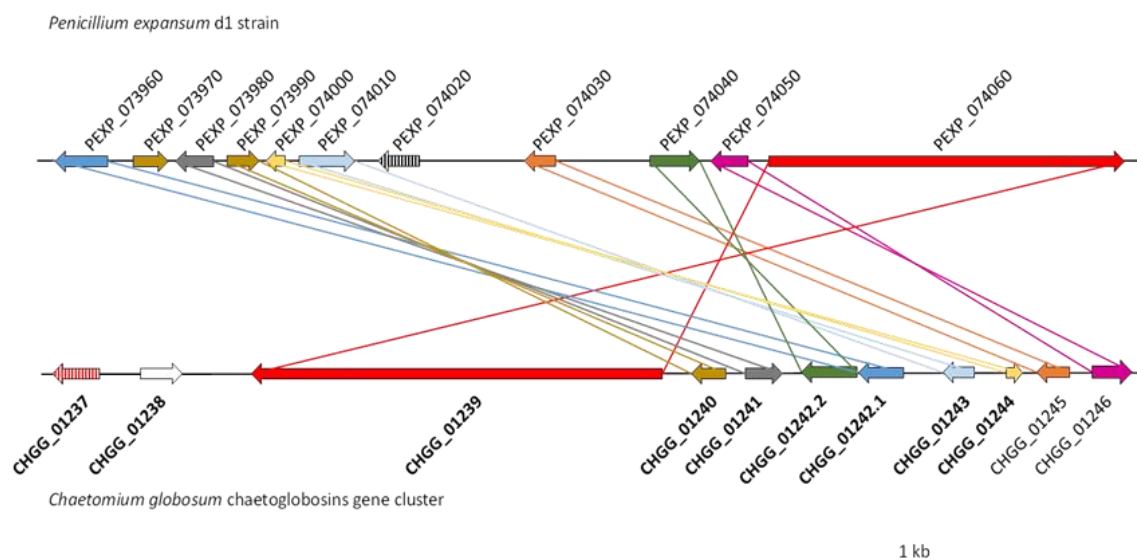


Figure 7. Comparaison du cluster des chaetoglobosines chez la souche d1 de *Penicillium expansum* et la souche *Chaetomium globosum*. Les gènes présentés en gras sont ceux décrits par Ishiuchi et al. (2013).

II.4.6. La biosynthèse des andrastines

Le cluster des gènes impliqués dans la biosynthèse des andrastines a été identifié dans de nombreuses espèces, parmi lesquelles *P. chrysogenum* (Matsuda et al., 2013) et comporte 11 gènes (*adrA-adrK*). Le cluster de biosynthèse des andrastines (Figure 8) a également été proposé chez *P. expansum* par Matsuda et al. (2016). Le cluster proposé chez cette espèce ressemble à ceux déjà décrits en ce qui concerne l'organisation des gènes ; cependant, il comporte uniquement 10 gènes, le gène *adrB* (qui code pour une protéine ayant une fonction

inconnue) n'y étant pas présent. Des résultats identiques ont été retrouvés chez *P. roqueforti* (Rojas-Aedo et al., 2017).



Figure 8. Cluster des andrastines chez *Penicillium expansum* (Matsuda et al., 2016)

II.4.7. La biosynthèse de la géosmine

Le cluster de la géosmine n'a pas encore été identifié chez *P. expansum*. Une étude protéomique a révélé la présence d'enzymes glycolytiques, ce qui peut expliquer l'implication de différentes voies (la voie glycolytique, de mévalonate, et de phosphate de méthylérythritol) dans la biosynthèse de géosmine chez *P. expansum* (Behr et al., 2014).

II.4.8. La biosynthèse des expansolides

Le cluster des gènes impliqués dans la biosynthèse des expansolides n'a pas encore été élucidé.

II.5. Pathogénicité et contrôle

II.5.1. Facteurs de virulence liés à la pathogénicité de *P. expansum*

Il est important de distinguer entre la pathogénicité et la virulence ; la pathogénicité est la capacité d'un agent pathogène d'induire une maladie dans son hôte, alors que la virulence est une propriété plutôt quantitative qui représente l'intensité de la maladie causée par le champignon (Yoder, 1980).

Comme déjà mentionné précédemment, *P. expansum* est un agent pathogène nécrotrophe des plaies qui sécrète divers facteurs de virulence qui permettent de détruire les cellules hôtes. Ces facteurs incluent des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire (cell wall degrading enzymes ou CWDE), des protéases et des acides organiques. La production de ces facteurs de virulence est modulée à la fois par des régulateurs intrinsèques et des facteurs environnementaux extrinsèques lors de l'interaction du pathogène avec son hôte (Errampalli, 2014). De nombreuses études ont permis d'identifier divers gènes codant pour des facteurs de virulence chez *P. expansum*. Certaines études ont confirmé l'implication des mycotoxines dans la pathogénèse des plantes. *P. expansum*, ainsi que nous l'avons vu, produit une large gamme de métabolites secondaires, qualifiés de mycotoxines (patuline, citrinine, chaetoglobosines, communésines, expansolides A et B, roquefortine C) (Luciano-Rosario et al., 2020). Sanzani et al. (2012) ont mis en évidence l'implication de la patuline dans la virulence de *P. expansum*. Cependant, le rôle de la patuline dans le mécanisme d'infection de *P. expansum* et sa classification comme facteur de virulence présentent des résultats contradictoires.

Snini et al. (2016) ont créé une souche mutante de *P. expansum* dépourvue du gène *patL* et les résultats obtenus ont montré que la souche mutante *PeΔpatL* a complètement inhibé la production de patuline chez le champignon. La délétion de ce gène a également engendré une réduction de la virulence au niveau des pommes infectées par la souche mutante. Cependant, lorsque la patuline exogène était ajoutée, la vitesse de croissance a repris un rythme normal. Ceci montre que la patuline est impliquée dans le développement de la pourriture au niveau des pommes, mais son rôle reste non essentiel vu que la souche mutante est capable de coloniser le fruit mais à un rythme plus lent. El Hajj Assaf et al. (2018) ont effectué un travail similaire, mais en créant une souche mutante *PeΔveA* qui a été utilisée pour infecter des pommes 'Golden Delicious'. La délétion du gène *veA* était à l'origine de l'inhibition totale de la production de patuline, et du coup de la réduction de la virulence de *P. expansum*. Ces observations sont en accord avec des rapports antérieurs suggérant que la patuline joue un rôle important mais non primordial dans la pathogénicité de *P. expansum* (Ballester et al., 2015 ; Sanzani et al., 2012; Snini et al., 2016). Des études de pathogénicité ont été effectuées sur 13 variétés de pommes

infectées par un mutant *PeΔpatL* en plus de la souche sauvage (WT) (Snini et al., 2016a). Les deux souches étaient capables d'infecter les pommes, et l'intensité des symptômes visualisés sur les pommes dépendaient non seulement de la production de patuline, mais aussi du patrimoine génétique des variétés de fruits. Ceci suggère que la patuline est un facteur d'agressivité plutôt qu'un facteur de virulence. Kumar et al. (2016) ont reporté que l'accumulation de patuline dans les fruits mûrs infectés par *P. expansum* est plus élevée. Ceci suggère que le niveau de maturité des fruits a également un effet sur la pathogénicité et la virulence du champignon.

Les informations concernant d'autres déterminants de virulence restent lacunaires. Comme tous les pathogènes de post-récolte, *P. expansum* sécrète des facteurs de virulence divers pour tuer les cellules hôtes incluant des CDWE, des protéases, des effecteurs, des glucose oxydases (GOX) et des métabolites secondaires. Les facteurs de virulence et de régulation impliqués dans la pathogenèse de *P. expansum* sont présentés dans la Figure 9.

Certains facteurs de virulence ont déjà été caractérisés tels que la polygalacturonase (PG), la serine-protéase PRT de la famille S8, la protéine NEP1-like (NLP1), les protéines LysM, GOX2, la citrinine et la patuline (Luciano-Rosario et al., 2020; Touhami et al., 2018).

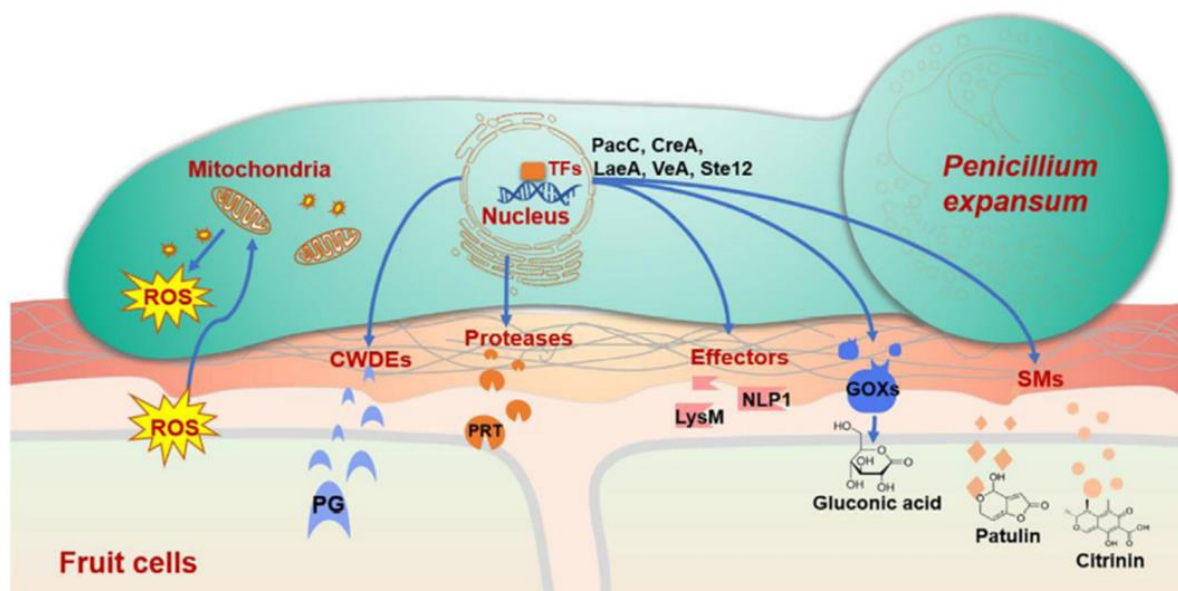


Figure 9. Les facteurs de virulence et de régulation impliqués dans la pathogenèse de *P. expansum* (Li et al., 2020).

Un facteur clé de la pathogénicité de *P. expansum* est sa capacité de sécréter des enzymes pectolytiques (Jurick et al., 2019). L'action d'une classe de ces enzymes, les polygalacturonases (les CWDEs les plus étudiées), entraîne la macération des tissus,

accompagnée d'une acidification, principalement causée par la sécrétion d'acide gluconique et d'acide fumarique (Jurick et al., 2012, 2010; Prusky et al., 2004; Vilanova et al., 2014). Cette acidification du tissu de la pomme active la transcription des polygalacturonases par le champignon ainsi que la production de patuline et empêche la sécrétion de trois enzymes codées par les gènes *patB*, *patO* et *patE* (Jurick et al., 2020).

D'autres facteurs jouant un rôle dans la virulence ont été signalés. Des études ont montré que PeSte12, l'orthologue de Ste12p chez *Saccharomyces cerevisiae* est impliqué dans la virulence du champignon de manière thermo-dépendante. La délétion du gène *PeSte12* a ainsi conduit à un retard du développement de la pourriture lorsque les pommes ont été stockées à 0 °C, la colonisation des pommes par le mutant n'était pas altérée lorsque les fruits étaient stockés à 20 °C (Sánchez-Torres et al., 2018).

Comme beaucoup de champignons pathogènes nécrotrophes, *P. expansum* sécrète des effecteurs. Parmi les effecteurs les plus étudiés, (Levin et al., 2019) se sont concentrés sur les protéines de type neuropiline 1 (NRP1). Ces protéines induisent la nécrose et la production d'éthylène par l'hôte. Deux gènes codant pour des protéines NLP ont été trouvés dans le génome de *P. expansum* et ont été caractérisés. Le gène *Penlp1*, codant pour une NLP de type 1, s'est avéré être principalement exprimé pendant l'infection du fruit. Sa délétion conduit à une diminution de la virulence. *PeNLP2*, une NLP de type 3, ne semble pas être impliquée dans la pathogénicité. Sa délétion n'altère pas la croissance du pathogène *in vivo* et les niveaux les plus élevés de son expression ont été mesurés dans les conidies dormantes.

Le rôle des effecteurs du motif de la lysine (*lysM*) dans la pathogénicité et la virulence de plusieurs pathogènes fongiques a également été démontré (de Jonge et al., 2010 ; Jonge et Thomma, 2009). Les effecteurs séquestrent les oligosaccharides de la chitine et empêchent l'immunité déclenchée par les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP). La chitine est le principal composant de la paroi cellulaire des champignons ; les oligosaccharides de chitine, qui ne sont autre que les produits de dégradation de la paroi cellulaire libérés pendant l'invasion fongique, agissent comme des PAMP dans les cellules végétales.

Deux études indépendantes ont rapporté 18 et 19 gènes codant pour des *LysM* dans les génomes de *P. expansum* respectivement (Chen et al., 2020 ; Levin et al., 2017). Parmi eux, quatre gènes (*PelysM1*, *PelysM2*, *PelysM3*, *PelysM4*) ont été activement transcrits pendant l'infection de la pomme (Levin et al., 2017). Afin de caractériser la fonction de ces quatre protéines, des mutants knockout ont été générés. Seule la délétion de *PelysM3* a affecté le

développement du champignon avec un taux de croissance légèrement plus faible sur milieu PDA, un taux de germination plus faible et des tubes germinatifs plus courts observés chez le mutant par rapport à la souche sauvage. Dans la deuxième étude, le mutant *PeΔlysM12* a montré une réduction du diamètre des lésions *in vivo* par rapport au WT. Dans une étude récente, 17 gènes ont été prédits comme étant potentiellement impliqués dans la pathogénicité de *P. expansum*. Parmi eux, le gène *Peprt* codant pour une peptidase S8 liée à la subtilisine est hautement exprimé pendant l'infection des pommes 24 h après inoculation (Levin et al., 2019). Les morphologies macro et microscopiques du mutant knockout ont été modifiées avec une réduction significative de la production de spores.

Récemment, Bartholomew et al. (2022) ont montré que la patuline est une toxine non spécifique capable d'inhiber d'autres champignons phytopathogènes post-récolte. De plus, l'efflux jouerait un rôle dans l'auto-résistance de *Penicillium* à la patuline pendant la germination des conidies.

II.5.2. Stratégies de contrôle contre *P. expansum*

En raison de la toxicité de la patuline, de nouvelles technologies de lutte contre *P. expansum* et/ou de détoxification des aliments contaminés par la patuline ont été récemment présentées (Moake et al., 2005 ; Tannous et al., 2018a ; Zhong et al., 2018 ; Settler-Ramirez et al., 2021). Les produits à base de pommes étant principalement obtenus à partir de pommes stockées, les stratégies pré- et post-récolte sont importantes pour la lutte contre la patuline.

Du stockage à la transformation, des stratégies d'atténuation de *P. expansum* ont été développées. Les nouvelles approches de lutte en développement comprennent les traitements physiques, la lutte biologique, les composés et protéines antifongiques, la résistance induite et les produits chimiques naturels (Zhong et al., 2018). Wang et al. (2018) ont étudié le pouvoir antifongique de la combinaison de cinnamaldéhyde et de citral (Cin/Cit) chez *P. expansum*. Il a été observé que la combinaison Cin/Cit pouvait ralentir ou inhiber totalement l'accumulation de la biomasse des mycéliums et la germination des spores de *P. expansum*. Les effets inhibiteurs sont liés à la dose et à la durée du traitement.

La lutte biologique devient actuellement l'une des méthodes de lutte les plus prometteuse pour le contrôle des champignons pathogènes (Chen et al., 2017; Janisiewicz and Korsten, 2002; Mukherjee et al., 2020). L'efficacité de *Pichia caribbica* dans la lutte contre la pourriture bleue produite par *P. expansum* a été étudiée par Cao et al. (2013), qui ont montré que la germination des spores et la croissance de *P. expansum* étaient inhibées par *P. caribbica*

in vitro. L'étude in vivo a montré que l'incidence de la pourriture bleue des pommes traitées par *P. caribbica* était significativement réduite. De plus, *P. caribbica* était capable de dégrader directement la patuline. L'application de Y29, une souche de levure antagoniste *Metschnikowia pulcherrima*, comme agent de biocontrôle sur la surface de pommes inoculées avec *P. expansum*, a inhibé la croissance fongique et la production de patuline pendant le stockage (Settier-Ramirez et al., 2021). D'autres traitements tels que l'utilisation d'acide salicylique ou de natamycine ont également réduit de 100 % la maladie causée par *P. expansum* (da Rocha et al., 2016 ; He et al., 2019).

Par ailleurs, de nouvelles technologies comprenant des méthodes physiques, chimiques et biologiques ont également été développées pour la détoxification des aliments contaminés par la patuline (Moake et al., 2005 ; Tannous et al., 2018a ; Zhong et al., 2018). Certaines méthodes comme l'absorption, l'irradiation, la détoxification par l'ozone et l'utilisation d'organismes biologiques réduisent de 90 % à 100 % la concentration initiale de patuline (Luciano-Rosario et al., 2020). Cependant, certaines méthodes physiques et chimiques affectent les éléments nutritifs et les propriétés organoleptiques des produits (Tannous et al., 2018). Pour cette raison, de nouvelles méthodes pour réduire la contamination par la patuline qui n'altèrent pas les normes sensorielles des produits sont nécessaires.

Parmi ces méthodes, les microbes antagonistes (bactéries, levures et champignons de type levure), retrouvés au niveau de la surface des plantes, de la rhizosphère, du sol agricole, de la mer et de certaines niches écologiques extrêmes, ont été explorés pour le contrôle des maladies de stockage au cours des dernières décennies. La lutte biologique par le biais de ces antagonistes microbiens est une option prometteuse et écologiquement saine pour contrôler la pourriture fongique (Dukare et al., 2022). Ces dernières années, plusieurs études ont évalué l'effet des mesures de biocontrôle des champignons pathogènes sur la biosynthèse des mycotoxines. L'effet des composés antifongiques sur la biosynthèse de la PAT n'est pas unique, car certains d'entre eux induisent une inhibition des gènes de la voie de biosynthèse de la PAT (Martínez-Culebras et al., 2021; Wang et al., 2018), tandis que d'autres (Delgado et al., 2022) stimulent sa production et son accumulation. Les levures constituent des agents de biocontrôle puissants qui sont parmi les plus étudiés dans la lutte contre la biosynthèse et l'accumulation de la PAT (De Curtis et al., 2004). De nombreuses études ont montré une réduction, à la fois in vitro et in vivo de la patuline par ces agents puissants de biocontrôle (Castoria et al., 2008; Mahunu et al., 2015; Nešić et al., 2021; Zheng et al., 2017).

Dans une étude récente (Palmieri et al., 2022), l'effet d'un agent de biocontrôle spécifique, *Papiliotrema terrestris* LS28, sur la production de PAT et la virulence chez *P. expansum* a été investigué. L'ensemble des résultats obtenus suggère que la modulation du pH par l'agent LS28 est importante pour lutter contre l'acidification du tissu hôte et, par conséquent, réduire la virulence de *P. expansum*. Par ailleurs, l'effet antagoniste fourni par cet agent a considérablement réduit la quantité totale de PAT produite par le pathogène.

Une autre alternative biologique est l'utilisation d'extraits botaniques, d'huiles essentielles, et de composés antimicrobiens ayant une nature biodégradable et non toxique (Dukare et al., 2022).

En outre, de nombreux traitements physiques, y compris l'emploi de plasma froid, le traitement par lumière pulsée (Herceg et al., 2015), et l'assainissement des produits pour réduire l'inoculation des agents pathogènes causals de la pourriture (Feliziani et al., 2016), appliquées séparément ou en combinaison, ont également été évalués.

L'objectif ultime de ces pratiques est d'empêcher la croissance des agents pathogènes afin de réduire dans une large mesure la détérioration qu'ils provoquent. Ces différentes approches, agissant ensemble de manière additive ou complémentaire, peuvent contrôler les infections causées par le genre *Penicillium* à un niveau élevé (97-99%). En outre, l'approche des obstacles à points multiples, utilisée pour gérer les agents pathogènes d'origine alimentaire dans l'industrie alimentaire, peut être utilisée de la même manière pour contrôler les altérations et assurer la sécurité des produits au cours de la chaîne d'approvisionnement alimentaire (Wisniewski et al., 2016).

III. La reproduction chez les champignons filamenteux

III.1. La reproduction asexuée chez les champignons filamenteux

La reproduction sexuée et asexuée sont des mécanismes d'évolution et de survie utilisés par un grand nombre d'espèces. Chez les champignons filamenteux, la reproduction asexuée ou conidiation (conidiogénèse) implique la formation de structures multicellulaires différenciées, appelées conidiophores, qui produisent des conidies haploïdes pigmentées à des moments déterminés du développement (Mooney et Yager, 1990). Le processus de conidiation commence par la croissance des hyphes aériens, suivie de la formation de conidiophores bien structurés et se termine par la maturation des conidies qui se dispersent facilement par voie aérienne (Adams et al., 1998a ; Ruger-Herreros et Corrochano, 2020).

La conidiation est régulée par plusieurs facteurs environnementaux dont l'aération, la limitation des nutriments et l'horloge circadienne. Des études ont montré que la conidiation est fortement inhibée dans les cultures submergées et qu'elle ne se produit que lorsque le mycélium est exposé à une interface d'air (Mooney et Yager, 1990). En outre, différentes voies de régulation impliquant des protéines régulatrices et des voies de signalisation, qui contrôlent et interviennent lors des différentes étapes de la conidiation, ont été proposées (Mirabito et al., 1989 ; Ruger-Herreros et Corrochano, 2020).

Neurospora crassa (Ruger-Herreros et al., 2011 ; Ruger-Herreros et Corrochano, 2020) et les membres du genre *Aspergillus* tels que *A. nidulans*, *A. fumigatus* et *A. flavus* ont été utilisés depuis longtemps comme organismes modèles pour étudier les processus de développement asexué (Ojeda-López et al., 2018).

Chez les champignons filamenteux, la croissance végétative commence par la germination d'une spore. Le processus de développement est programmé avec précision depuis la germination jusqu'à la formation de conidiophores, pour être régulé à un moment précis du cycle de vie du champignon (Park et Yu, 2012). La présence de nutriments, y compris les sels inorganiques, les sucres et les acides aminés, ainsi que l'eau et l'air sont nécessaires pour une bonne germination des conidies (Baltussen et al., 2020). L'initiation de la reproduction asexuée ou conidiation peut avoir lieu en réponse à différents facteurs internes (développement fongique) ou externes (carence en nutriments) (Baltussen et al., 2020).

Le champignon modèle *A. nidulans* a été utilisé pour déchiffrer le processus de conidiogénèse chez le genre *Penicillium*.

Différentes étapes de la formation des conidiophores chez *Penicillium* ont été identifiées (Roncal et Ugalde, 2003) :

1. Germination des spores et formation du mycélium. Les hyphes végétatifs résultant de la croissance apicale arrêtent leur extension et commencent le développement du conidiophore.
2. Lorsque la croissance végétative s'arrête, les hyphes aériens commencent à se développer, délimitées par une cloison gonflée, et forment à leur tour des branches subapicales.
3. Les bourgeons subapicaux formés commencent à se différencier en phialides.
4. Enfin, à l'extrémité des phialides, une série de conidies germent, donnant lieu à la formation de structures en brosse caractéristiques appelées pénicilles.

III.1.1. La voie de régulation centrale (CRP)

Comme mentionné auparavant, le processus de conidiation se déroule dans un temps et un espace génétiquement contrôlé. Des études précédentes ont montré que la reproduction asexuée est régulée par des gènes spécifiques de conidiation qui activent dans un ordre hiérarchique le développement des conidiophores ainsi que la formation et la maturation des conidies (Zhang et al., 2019). Des recherches centrées sur *A. nidulans* ont suggéré que les gènes *brlA* (*bristle*), *abaA* (*abacus-like*) et *wetA* (*wet-white*) forment une voie de régulation centrale (CRP) (Adams et al., 1998b ; Boylan et al., 1987 ; Mirabito et al., 1989 ; Zhang et al., 2019) contrôlant l'expression des gènes spécifiques de la conidiation (Figure 10), qui sont fortement conservés chez le genre *Aspergillus* (Alkhayyat et al., 2015 ; Navarro-Bordonaba et Adams, 1994 ; Park et Yu, 2016). Boylan et al. (1987) ont cloné et caractérisé les gènes *brlA*, *abaA* et *wetA* et ont déterminé par accumulation de leurs ARN l'ordre d'expression de ces régulateurs : *brlA* → *abaA* → *wetA* chez *A. nidulans*. Les ARN codés par *brlA* et *abaA* s'accumulent spécifiquement dans les cellules des conidiophores tandis que les ARN codés par *wetA* s'accumulent dans les conidies matures. La mutation des gènes *brlA*, *abaA* et *wetA* n'affecte pas la croissance végétative (Navarro-Bordonaba et Adams, 1994). Par contre, l'absence de *brlA* bloque complètement la reproduction asexuée et la délétion d'*abaA* conduit à la formation de phialides anormaux qui bloquent la formation de conidies, tandis que la mutation de *wetA* entraîne l'autolyse des spores pendant les étapes finales de la différenciation (Adams et al., 1998).

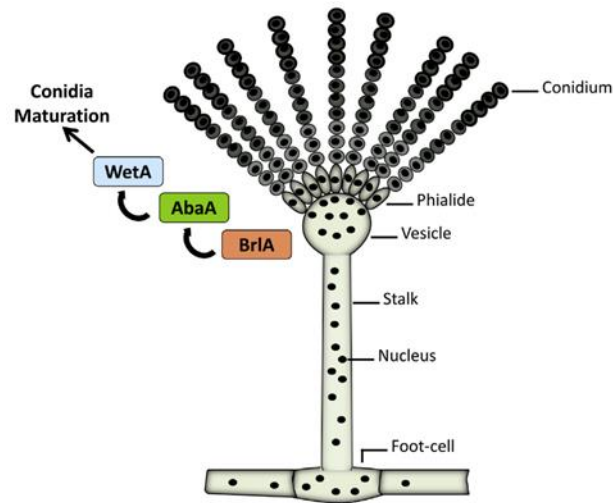


Figure 10. Schéma de la voie de régulation de la conidiation chez *A. fumigatus*. BrlA est nécessaire pour la formation des vésicules, AbaA est nécessaire pour la différenciation des phialides et des conidies et WetA est nécessaire pour la maturation et l'intégrité de la paroi cellulaire de la spore (Alkhayyat et al., 2015).

III.1.2. Protéines régulatrices en amont de la CRP

Les gènes impliqués dans la CRP sont fondamentaux pendant la conidiogénèse. Cependant, d'autres protéines régulatrices sont également impliquées en amont et en aval du processus activant ou réprimant l'expression des gènes de la CRP et interviennent pendant la phase de maturation conidienne. A titre d'exemple, chez *A. niger*, les gènes *mtdA* et *mpdA* sont deux gènes codant pour des mannitol déshydrogénases. Ces dernières ne font pas partie de la CRP mais sont essentielles à la conidiogénèse, en raison de l'importance du mannitol pour la survie des conidies (Adams et al., 1998 ; Baltussen et al., 2020 ; Rodríguez-Urra et al., 2012).

III.1.3. Les régulateurs en amont de la CRP

La transition programmée de la croissance des hyphes au développement des conidiophores se produit avec l'activation de *brlA*, qui nécessite plusieurs régulateurs en amont. Chez le genre *Aspergillus*, *brlA* est contrôlé par des activateurs de développement en amont (UDA), qui consistent en six membres des 'gènes « fluffy » : *fluG*, *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD* et *flbE*. Des mutations dans tous ces gènes entraînent une réduction de l'expression de *brlA*, avec des colonies aconidiennes et des phénotypes duveteux (Lee et Adams, 1996 ; Ojeda-López et al., 2018 ; Wieser et al., 1994).

FluG est un facteur de transcription en amont de la CRP qui active les autres gènes « fluffy » (Figure 11). Il est responsable de la synthèse d'un facteur diffusible endogène (le

déhydroaustinol) qui s'accumule dans les hyphes aériens et induit la conidiation lorsque ce facteur est en conjonction avec le diorcinol (Rodríguez-Urra et al., 2012).

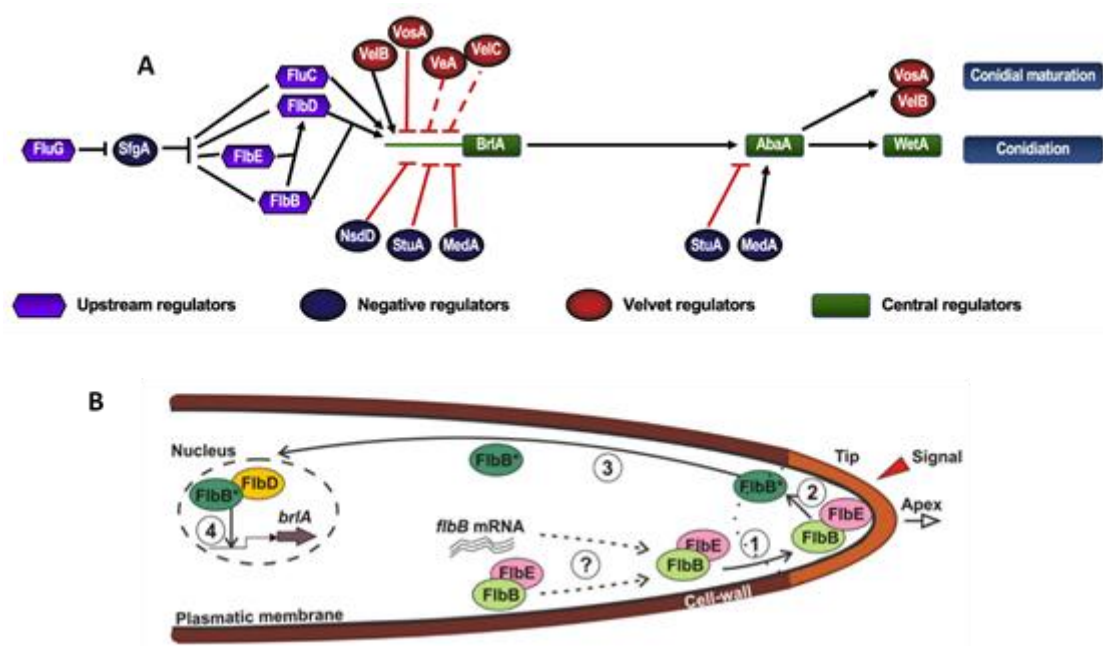


Figure 11. Activateurs du développement en amont de la CRP (gènes « fluffy »). A) Modèle génétique de la régulation du développement des conidiophores chez *A. nidulans* (Ojeda-López et al., 2018). B) Dynamique et activité transcriptionnelle de FibB-FibE et FibB-FibD dans les hyphes végétatifs.

Le gène *flbA* est un autre membre des gènes « fluffy », qui joue un rôle positif dans l'activation du développement asexué chez les champignons. Il favorise la conidiation en supprimant la voie de signalisation médiée par la protéine G, qui inhibe le développement asexué chez les champignons mais favorise la croissance végétative par le biais de *pkaA* (Lee et Adams, 1996 ; Li et al., 2017). Lee et Adams (1996) ont proposé que *flbA* et *fluG* fonctionnent de manière interdépendante pour activer l'accumulation de l'ARNm de *brlA* et induire le développement des conidiophores.

En plus de la voie dépendante de FluG chez *A. nidulans*, l'hétérodimère FibB-FibE est nécessaire pour l'expression de *flbD*, qui est également un facteur de croissance important. Ceci conduit ensuite à la formation de l'hétérodimère FibB-FibD, requis pour l'activation de *brlA* (Figure 11) (Alkhayyat et al., 2015 ; Oiartzabal-Arano et al., 2016).

FibB peut également être un facteur clé dans la transition des métules vers les phialides chez *A. nidulans* (Ojeda-López et al., 2018). FibD possède un domaine de liaison à l'ADN de type Myb, ce qui pourrait indiquer son implication dans le remodelage de la chromatine au niveau du promoteur de *brlA* pour faciliter son expression (Ojeda-López et al., 2018).

FlbC est une protéine à doigt de zinc C_2H_2 impliquée dans la liaison directe sur le promoteur de *brlA* et dans l'induction de son expression. Chez certaines espèces telles que *Fusarium* et *N. crassa*, les mutants nuls $\Delta flbC$ ont entraîné une réduction des hyphes aériens et de la conidiation (Boni et al., 2018). Les gènes *flbC* et *flbD* codent pour des protéines de liaison à l'ADN, ce qui indique qu'elles fonctionnent comme des facteurs de transcription en contrôlant l'activation de gènes spécifiques du développement (Lee et Adams, 1996).

III.2. La reproduction sexuée chez les genres *Aspergillus* et *Penicillium*

Les champignons sont des organismes eucaryotes inhabituels dans la mesure où au moins 20 % de toutes les espèces connues ne se reproduisent pas sexuellement et semblent s'appuyer uniquement sur des modes asexués de reproduction. Ceci est très surprenant puisqu'une phase sexuelle dans le cycle de vie, même si elle n'est qu'intermittente, présente plusieurs avantages évolutifs par rapport à une reproduction purement asexuée (Dyer et Paoletti, 2005 ; Lee et al., 2010). Dans le cas spécifique des champignons, la reproduction sexuée confère également la capacité de produire des structures de survie dormantes et un état diploïde dit condensateur transitoire qui pourrait permettre la sélection d'ensembles de gènes favorables à l'évolution dans une « arène de sélection » (Aanen et Hoekstra, 2007 ; Heitman, 2010 ; Lee et al., 2010). La reproduction sexuée conduit à la formation d'ascospores à l'intérieur de cleistothèces fermés, qui se décomposent à maturité pour libérer passivement les spores sexuelles.

Les membres des genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont parmi les champignons les plus répandus sur terre. Bien que de nombreuses espèces soient également capables de se reproduire sexuellement, sur les 250 espèces du genre *Aspergillus* (Geiser et al., 2007 ; Samson et Varga, 2000) et les 225 espèces du genre *Penicillium* (Pitt et al., 2000) recensées, 64 % et 73 % respectivement, n'ont pas de forme sexuelle connue. Il a été suggéré précédemment que ces espèces asexuées ont évolué à partir des espèces sexuées apparentées en raison de la perte de la capacité à subir la méiose (Geiser et al., 1996). Cependant, un certain nombre de critères fournissent maintenant des preuves que beaucoup de ces espèces asexuées pourraient avoir un potentiel de reproduction sexuelle (Dyer et Paoletti, 2005 ; Gow, 2005).

Une série de plus de 75 gènes qui sont nécessaires à la reproduction sexuelle chez les espèces du genre *Aspergillus* a été identifiée. Ces gènes sont impliqués dans des processus tels que la détection de l'environnement, la formation de corps fructifères et la production d'ascospores (Dyer et O'Gorman, 2011). D'autres gènes ont été décrits chez les levures, qui sont spécifiquement nécessaires à la méiose (Butler et al., 2009 ; Galagan et al., 2005). On pourrait s'attendre à ce que de tels gènes liés à la reproduction sexuée accumulent des mutations

délétères ou même soient perdus chez les espèces purement asexuées, chez lesquelles aucune contrainte fonctionnelle ne s'oppose à leur conservation. Cependant, des études génomiques ont révélé que des espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* supposées asexuées contiennent au contraire un répertoire apparemment fonctionnel de cette « machinerie sexuelle ». Une recherche effectuée avec BLAST (basic local alignment search tool) des génomes d'*A. fumigatus* et d'*A. oryzae*, supposés asexués, a révélé la présence de 215 gènes liés à la reproduction sexuée, qui semblent tous potentiellement fonctionnels en raison de l'absence de mutations du cadre de lecture ou de codons stop prématurés (Galagan et al., 2005). De même, l'analyse du génome d'*A. niger*, présumé asexué, a révélé un ensemble complet de gènes pour le développement sexuel précoce (Pel et al., 2007). Parallèlement, des homologues apparemment fonctionnels de gènes impliqués dans l'accouplement et la méiose ont été trouvés dans le génome de *P. marneffeii* asexué (Woo et al., 2006). La découverte importante que le système de reproduction sexuée de certaines espèces est régi par les gènes MAT était d'un intérêt particulier (Dyer et al., 2007). La reproduction sexuelle chez les champignons peut être hétérothallique, nécessitant des souches de groupes de compatibilité végétative avec des loci MAT opposés, ou homothallique, auto-reproduction où le champignon présente les deux loci MAT (Paoletti et al., 2007). Il est suggéré que, outre la reproduction sexuelle, les loci MAT sont impliqués dans plusieurs autres processus cellulaires (Dyer et O'Gorman, 2012). Les loci MAT sont formés par deux régions génétiques, appelées MAT1-1 et MAT1-2 chez les Ascomycètes. MAT1-1 code pour un facteur de transcription à domaine α , et MAT1-2 code pour un facteur de transcription avec un domaine de groupe à haute mobilité (HMG) (Dyer et Kück, 2017). Certaines études ont analysé les loci MAT et leurs ratios chez la section Flavi et ont montré que la grande majorité des champignons sont hétérothalliques (Geiser et al., 1998 ; Carbonne et al., 2007 ; Ramirez-Prado et al., 2008 ; Horn et al., 2011), néanmoins on ne sait pas si toutes les espèces présentent les deux idiomorphes.

III.3. La régulation de la reproduction par VelB et LaeA chez les champignons filamenteux

De nombreuses études ont été réalisées et ont montré l'implication du complexe velvet, et plus particulièrement de VelB et LaeA dans la régulation de la reproduction chez différentes espèces de champignons filamenteux.

Le rôle de VelB dans la régulation de la reproduction chez *A. nidulans* a été largement investigué (Ozgür Bayram et al., 2008a; Ni and Yu, 2007; Park et al., 2012a; Sarikaya-Bayram

et al., 2015a). Ces différentes études ont montré que la délétion de *velB* entraîne la réduction du nombre de conidies et l'inhibition des gènes clés de régulation de la reproduction asexuée, *brlA*, *abaA*, *wetA* et *vosA*. De plus, des analyses immunologiques *in vivo* ont révélé que VelB interagit principalement avec VosA dans les spores asexuées et sexuées, et que ces deux protéines jouent un rôle interdépendant dans la viabilité des spores, la biogenèse du tréhalose et le contrôle de la germination des conidies. Des études génétiques *in vitro* ont également révélé que AbaA régule positivement l'expression des ARNm de *velB* et *vosA* pendant la sporogenèse, et se lie directement à leurs promoteurs. L'hétérodimère VelB-VosA joue un double rôle dans l'activation des gènes associés à la maturation des spores, notamment *wetA* et *tpsA*, et dans la régulation par rétroaction négative de *brlA* et d'autres gènes du développement. En résumé, ces études confirment que VelB agit comme un régulateur positif du développement asexué et régule la maturation des spores, la biogenèse du tréhalose et la germination en interagissant avec VosA chez *A. nidulans*.

Chez *A. fumigatus*, la délétion d'*AfuvosA*, *AfuveA* et *AfuvelB* provoque un développement asexué hyperactif (conidiation) et une accumulation précoce et élevée d'*AfubrlA* au cours du développement (Park et al., 2012). De plus, l'absence d'*AfuvosA*, *AfuveA* ou *AfuvelB* entraîne la formation abondante de conidiophores et une accumulation très élevée de l'ARNm d'*AfubrlA* en culture liquide submergée, ce qui suggère qu'ils agissent comme répresseurs de la conidiation (Park et al., 2012). La délétion d'*AfuvosA* ou d'*AfuvelB* entraîne une réduction de la quantité de tréhalose conidial, de la viabilité des spores à long terme, de la tolérance des conidies aux stress oxydatif et UV, et de la germination accélérée et élevée des conidies, indépendamment de la présence ou de l'absence d'une source de carbone externe, suggérant un rôle interdépendant de ces protéines dans de nombreux aspects du développement chez *A. fumigatus* (Park et al., 2012).

Le rôle de trois membres du complexe velvet, entre autres VelB, dans la régulation de la reproduction a également été étudié chez *P. chrysogenum* (Kopke et al., 2013a). La création de différentes souches knockout simples et doubles a permis de conclure que les membres de cette famille jouent des rôles opposés dans la conidiation : PcVelB et PcVosA favorisent la conidiation, alors que PcVelC a un effet inhibiteur.

Les études portant sur LaeA se concentrent principalement sur son rôle de régulateur du métabolisme secondaire chez différentes espèces fongiques. Cependant, certaines études s'intéressent à la participation de cette protéine dans la régulation de la reproduction chez les champignons filamenteux.

Chez *A. flavus*, LaeA joue le rôle de régulateur positif de la conidiation (Kale et al., 2008a). En effet, la délétion de *laeA* entraîne, outre l'inhibition de la production d'aflatoxine et de sclérotés, une diminution marquée dans la production de conidies. Une autre espèce appartenant au genre *Aspergillus*, *A. fumigatus* a fait l'objet d'une étude portant sur l'implication de LaeA dans la régulation de la conidiation (Sugui et al., 2007). Les résultats de cette étude ont confirmé l'intervention de LaeA en tant que régulateur positif de la production de conidies.

Des mutants de délétion pour le gène *laeA* ont aussi été créés chez des espèces appartenant au genre *Penicillium*. Ainsi, Kosalková et al. (2009) ont montré l'intervention de LaeA lors de la différenciation asexuée chez *P. chrysogenum*. Dans une autre étude effectuée sur des souches de *P. digitatum*, les résultats ont également confirmé l'implication de LaeA dans la production de conidies, puisque cette dernière était réduite de moitié chez les mutants $Pd\Delta laeA$ en comparaison de la souche sauvage. En outre, l'expression de différents régulateurs clés de la conidiation (BrlA, FlbA, FlbC, FlbD et FluG) a été fortement inhibée chez les mutants de délétion $\Delta laeA$, renforçant l'hypothèse de l'implication de LaeA dans la régulation de la conidiation chez *P. digitatum* (Zhu et al., 2020).

IV. Régulation du métabolisme secondaire chez les *Aspergillaceae*

Regulation of secondary metabolism in the *Penicillium* genus: Review – International
Journal of Molecular Science (Accepté)

Review

Regulation of Secondary Metabolism in the *Penicillium* Genus

Christelle El Hajj Assaf ^{1,2}, Chrystian Zetina-Serrano ¹, Nadia Tahtah ^{1,3}, André El Khoury ³, Ali Atoui ⁴, Isabelle P. Oswald ¹, Olivier Puel ^{1,*} and Sophie Lorber ¹

¹ Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, 31027 Toulouse, France; christel.hajjlassaf@hotmail.com (C.H.A.); Chrystian-Del-Carmen.Zetina-Serrano@inrae.fr (C.Z.-S.); nadia.tahtah@inrae.fr (N.T.); isabelle.oswald@inrae.fr (I.P.O.); sophie.lorber@inrae.fr (S.L.)

² Institute for Agricultural and Fisheries Research (ILVO), member of Food2Know, Brusselsesteenweg 370, 9090 Melle, Belgium; christel.hajjlassaf@hotmail.com

³ Centre d'analyse et de recherche, Unité de recherche technologies et valorisations agro-alimentaires, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph, P.O. Box 17-5208, Mar Mikhael, Beirut 1104, Lebanon; andre.khoury@usj.edu.lb

⁴ Laboratory of Microbiology, Department of Life and Earth Sciences, Faculty of Sciences I, Lebanese University, Hadath Campus, P.O. Box 5, Beirut 1104, Lebanon; aatoui@ul.edu.lb

* Correspondence: olivier.puel@inrae.fr; Tel.: +33-582 066 336

Received: 9 November 2020; Accepted: 8 December 2020; Published: date

Abstract: *Penicillium*, one of the most common fungi occurring in a diverse range of habitats, has a worldwide distribution and a large economic impact on human health. Hundreds of the species belonging to this genus cause disastrous decay in food crops and are able to produce a varied range of secondary metabolites, from which we can distinguish harmful mycotoxins. Some *Penicillium* species are considered to be important producers of patulin and ochratoxin A, two well-known mycotoxins. The production of these mycotoxins and other secondary metabolites is controlled and regulated by different mechanisms. The aim of this review is to highlight the different levels of regulation of secondary metabolites in the *Penicillium* genus.

Keywords: *Penicillium*; secondary metabolism; regulation; virulence; control of gene expression; transcription factors

1. Introduction

Studies have estimated the existence of at least 2.2–3.8 million fungal species on Earth, from which only around 10% have been isolated and described [1,2]. *Penicillium*, one of the most common fungi in a various range of habitats, has a worldwide distribution and a large economic impact on human life. This genus is of great importance in numerous and diverse fields, such as food spoilage, biotechnology, plant pathology, and medicine [3,4], and currently contains 483 accepted species [5]. Several of these species, classified as pre- and post-harvest pathogens, can lead to catastrophic decay in food crops, as described by Frisvad and Samson [6], Pitt and Hocking [7], and Samson et al. [8]. *Penicillium* can also produce a varied range of secondary metabolites, including several harmful mycotoxins [9], antibacterial [10–14] and antifungal compounds [15], immunosuppressants, and cholesterol-lowering agents [16–19]. The most iconic example of a drug of fungal origin is penicillin, the first antibiotic substance in history [20].

The biosynthesis of several secondary metabolites, such as mycotoxins, depends on several environmental cues including the substrate, pH, temperature, water activity, interrelationships with other microorganisms, and the interactions of these different factors in the natural environment [21–23].

Secondary metabolites are products of enzymatic cascades starting when backbone enzymes such as polyketide synthases (PKSs), non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs), terpene cyclases (TCs), and dimethylallyl tryptophan synthases (DMATSs) catalyze, respectively, the rearrangement or condensation of simple primary metabolites, such as acetyl-CoA, amino acids, or isoprene units, resulting in more complex secondary metabolites [24]. Different metabolic pathways can lead to their formation (Figure 12). Fungal secondary metabolites are classified into five categories according to their structures and their precursors: polyketides, cyclic terpenes, non-ribosomal peptides, indole alkaloids, and hybrids (Figure 12) [25]. Other enzymes named tailoring enzymes are also needed and interfere in the catalysis of subsequent reactions in the biosynthetic pathways of mycotoxins. The structural diversity of mycotoxins results from the variety of chemical reactions (cyclization, aromatization, glycosylation, hydroxylation, methylation, acetylation, and epoxidation) involved in their biosynthesis [26] and leads to their broad spectrum of biological properties and functions. The combined involvement of backbone enzymes in the same biosynthesis pathway infinitely broadens this structural diversity of secondary metabolites. This diversity is also enriched by the infrequent existence of crosstalk between different biosynthetic pathways [27].

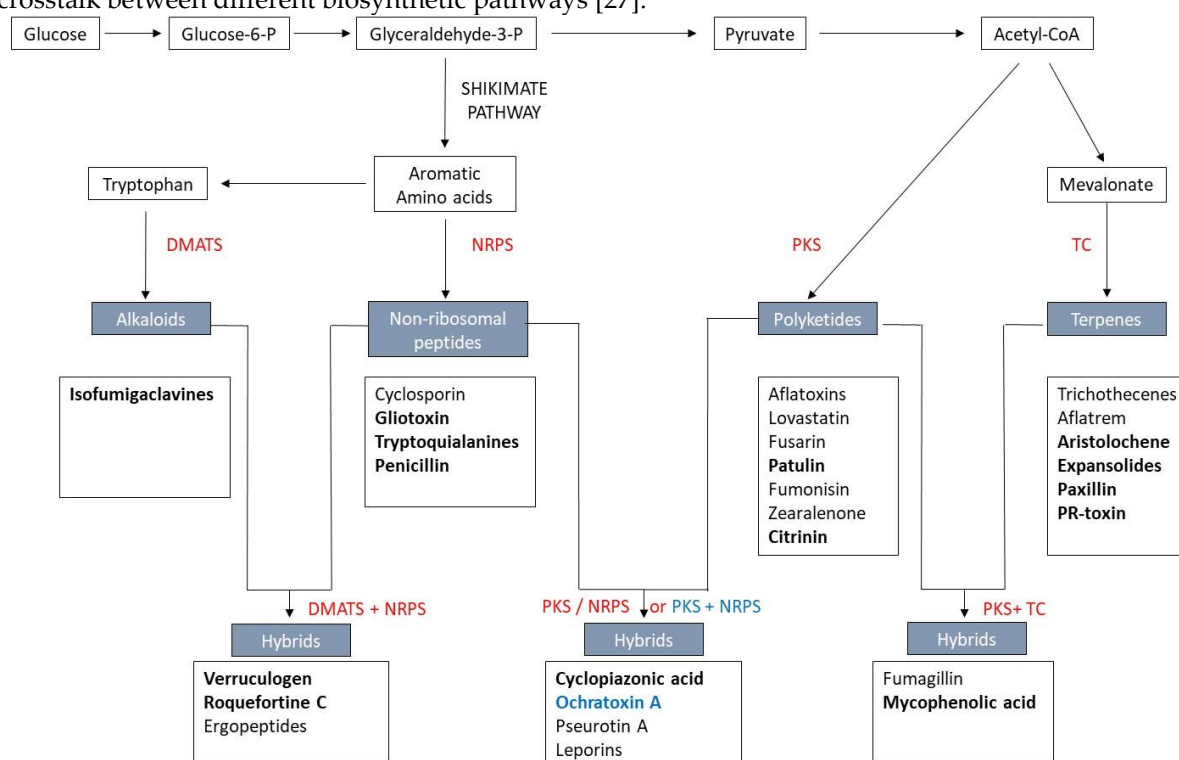


Figure 12. Biosynthetic pathways of secondary metabolites. In grey boxes, the typical backbone of secondary metabolites. In grey, the main mycotoxins produced by these pathways. In red, the enzymes associated with each pathway. In blue, separate PKS and NRPS are involved in ochratoxin A (OTA) biosynthesis; NRPS: non-ribosomal peptide synthetase, PKS: polyketide synthase, TC: terpene cyclase, DMATS: dimethylallyl tryptophan synthase. In **bold**, mycotoxins produced by *Penicillium* species.

Enzymes are activated at the same time, and the newly synthesized intermediates are consecutively metabolized by the following enzymes. This phenomenon is possible due to the cluster organization of the genes encoding the enzymes involved in the biosynthesis of the metabolites in the same chromosomal region. These genes are often co-activated by a specific transcription factor (TF) located within the clusters [28]. Based on bioinformatics analysis and other studies, it was proven that fungal genomes exhibit different and numerous predicted secondary metabolite clusters. A recent review estimated the number of fungal biosynthetic gene clusters (BGCs) at several million [29]. For the two well-known genera of *Aspergillus* and *Penicillium* alone, which contain 446 and 483 species, respectively [5], the number of non-redundant clusters is approximately 25,000. In filamentous fungi, the activation

of specific TFs and the resulting production of fungal secondary metabolites is controlled at a higher hierarchical level by global TFs. Understanding the mechanisms underlying mycotoxin biosynthesis contributes to defining/identifying strategies or mechanisms to regulate them and reduce their production [30].

Numerous studies have focused on regulators impacting the formation of secondary metabolites in *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fusarium*, but few reviews have explored the complex and multi-layered regulation of fungal secondary metabolism [31–34]. While several excellent articles reviewed the different regulatory mechanisms known for *Aspergillus* [29,35–37], this review aims to deepen the understanding of the regulation of secondary metabolism in *Penicillium* and highlight all the regulatory mechanisms that can occur.

2. Regulation of Secondary Metabolism

For the synthesis of any secondary metabolite, the regulation of its cluster involves a number of factors for activation or repression. This regulation occurs at different levels. Most secondary metabolite clusters have genes encoding TFs that act directly on all other genes located within the cluster. Expression of these internal regulators also depends on other, more global TFs encoded by genes unrelated to the BGCs, which are themselves under the control of different physiological and/or environmental stimuli. An adaptation to a specific environment may also result in the biosynthesis of a certain secondary metabolite. This biosynthesis is connected and regulated by different signaling transduction pathways. Finally, epigenetic regulation, including modification of the chromatin and nucleosome structure, can yield transcriptional control and impact secondary metabolite synthesis extensively [38]. In the following section, the different regulatory systems studied in *Penicillium* will be discussed.

2.1. Specific Transcription Factors/Cluster-Specific Regulators

Gene clusters involved in secondary metabolite biosynthesis often include a gene encoding a TF that specifically acts and modulates the expression of the other genes in that cluster (e.g., *patL*, *calC*, and *ctnA* in patulin, calbistrin, and citrinin biosynthetic pathways, respectively). This gene has a switching role within the cluster (Figure 13). The TFs regulate gene expression by binding specifically to the promoters of the genes involved.

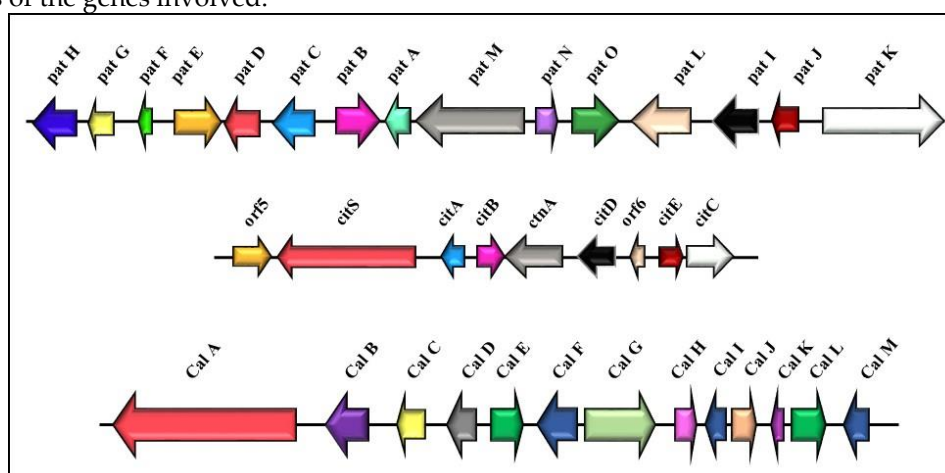


Figure 13. Gene clusters of the patulin biosynthesis pathway (the first one at the top) (15 genes, 40 kb) [39] and the citrinin biosynthesis pathway (the middle group) (nine genes, 22 kb) [40,41] in *Penicillium expansum*; cluster of the calbistrin biosynthesis pathway (the third one at the bottom) (13 genes, 35kb) in *Penicillium decumbens* [42].

Several studies comparing TF sequences have shown that these TFs can be classified into different families based on the similarities in their protein sequences. We can distinguish between zinc finger proteins, proteins called helix-turn-helix, and leucine zippers [43]. Nevertheless, almost 90% of the

potential gene clusters involved in the synthesis of fungal polyketides belong to the family of zinc finger TFs (Cys₂His₂, Cys₄, or Zn(II)₂Cys₆) [43–45]. Proteins of the Zn(II)₂Cys₆ family are found exclusively in fungi and yeasts [46], and the C₆ type zinc finger DNA binding protein motif (Cys₆) is frequently encountered in TFs. Cys₆ has been identified on more than 80 proteins found mainly in fungi [43] and is generally considered a transcriptional activator (Table 6). Only in *Saccharomyces cerevisiae* are the zinc finger proteins (ARGR2, LEU3, and UME6) activators and repressors [47–50]. Subsequently, the number of proteins belonging to the Zn(II)₂Cys₆ family has increased significantly due to the number of fungal genomes that have since been sequenced. Numerous examples of Zn(II)₂Cys₆ TFs identified as being involved in the secondary metabolism of fungi genera other than *Penicillium* have been largely described in the literature. As examples, we can quote AflR (aflatoxins), Bik5 (bikaverin), and CtnA (citrinin) for *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Monascus*, respectively (Table 6).

Table 6. Examples of identified Zn(II)₂Cys₆ and leucine zipper transcription factor (TF) involvement in secondary metabolism in fungi; adapted and updated from Yin and Keller [46].

TF	Biosynthetic Gene Cluster	TF Family	Species	References
			<i>Aspergillus flavus</i>	
AflR	Aflatoxin/Sterigmatocystin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Aspergillus nidulans</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	[51–55]
AsaR	Aspergillic Acid	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Aspergillus flavus</i>	[56]
GliZ	Gliotoxin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Penicillium lilacinoechinulatum</i>	[57,58]
XanC	Xanthocillin	Basic Leucine zipper	<i>Aspergillus fumigatus</i>	[59]
FapR	Fumagillin/Pseurotin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Aspergillus fumigatus</i>	[60]
ZEB2	Zearalenone	Basic Leucine zipper	<i>Fusarium graminearum</i>	[61]
SimL	Cyclosporine	Basic Leucine Zipper	<i>Tolypocladium inflatum</i>	[62]
OtaR1	Ochratoxin A	Basic Leucine zipper	<i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus westerdijkiae</i> <i>Penicillium nordicum</i>	[63]
SirZ	Sirodesmin PL	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Leptosphaeria maculans</i>	[58]
MlcR	Compactin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Penicillium citrinum</i>	[64]
Bik5	Bikaverin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Fusarium fujikuroi</i>	[65]

DEP6	Depudecin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Alternaria brassicicola</i>	[66]
ZFR1 FUM21	Fumonisin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Fusarium verticillioides</i>	[67,68]
CTB8	Cercosporin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Cercospora nicotianae</i>	[69]
GIP2	Aurofusarin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Gibberella zeae</i>	[70]
CtnA	Citrinin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Monascus purpureus</i> <i>Monascus ruber</i> <i>Penicillium expansum</i>	[40,41,71]
LovE	Lovastatin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Aspergillus terreus</i>	[72,73]
ApdR	Aspyridone	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Aspergillus nidulans</i>	[74]
CtnR	Asperfuranone	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Aspergillus nidulans</i>	[75]
MdpE	Monodictyphenone/ Emodin Analogs	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Aspergillus nidulans</i>	[76]
Cmr1p	Melanin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Colletotrichum lagenarium</i>	[77]
Pig1p	Melanin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Magnaporthe grisea</i>	[77]
GsfR1	Griseofulvin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Penicillium griseofulvum</i>	[78]
MokH	Monacolin K	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Monascus pilosus</i>	[79]
CalC	Calbistrin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Penicillium decumbens</i>	[42]
CnsN	Communesins	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Penicillium expansum</i>	[80]
Orf2	Varicidin A and B	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Penicillium variable</i>	[81]
Orf10	PR-Toxin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium roqueforti</i>	[82,83]
MacR	Macrophorin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Penicillium terrestris</i>	[84]
PatL	Patulin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Penicillium expansum</i>	[85]
SorR1 SorR2	Sorbicillin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Penicillium chrysogenum</i>	[86]
TqaK	Tryptoquialanines	Basic leucine zipper	<i>Penicillium aethiopicum</i> <i>Penicillium digitatum</i>	[87,88]
Sol4	Solanapyrone	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Ascochyta rabiei</i>	[89]
RoIP	Leucinostatin	Zn(II) ₂ Cys ₆	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	[90]

Gliotoxin, a secondary fungal metabolite belonging to the class of epipolythiodioxopiperazines (ETPs) and characterized by the presence of a sulfur-bridged dioxopiperazine ring [91], is produced by some *Aspergillus* and *Penicillium* species, such as *Penicillium lilacinoechinulatum* [92], a strain of this species was misidentified as *Penicillium terlikowskii* in a study by Waring et al. [92,93]. Within its cluster, a Zn(II)₂Cys₆ finger transcription regulator, GliZ, was identified to be responsible for gliotoxin induction and regulation. A mutation of the *gliZ* (Δ *gliZ*) gene in *Aspergillus fumigatus* resulted in the loss of gliotoxin production, while overexpression of *gliZ* increased the production of gliotoxin [94,95]. In *P. lilacinoechinulatum*, a homologous gene is present in the genome, but the heterologous complementation of the *A. fumigatus* Δ *gliZ* mutant with P*gliZ* failed to restore gliotoxin production [58]. The *mlcR* gene encoding a putative 50.2-kDa protein characterized by a Zn(II)₂Cys₆ DNA-binding domain was shown to be involved in the regulation and biosynthesis of ML-236B (compactin) in *Penicillium citrinum* [96].

Another gene encoding PatL, a specific TF in *Penicillium expansum*, was shown to affect patulin production [85]. The protein encoded by this gene has two conserved domains, one of which encodes a Cys₆ DNA binding site and the other of which was found in the TFs of the superfamily of zinc finger TFs. Orthologous genes of *patL* involved in the patulin metabolic pathway were found in other filamentous fungi genomes, such as *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium paneum*, *Penicillium vulpinum*, *Penicillium carneum*, *Penicillium antarcticum* [97], and *Aspergillus clavatus* [98]. Sometimes, BGCs such as the sorbicillin gene cluster can contain two genes encoding TFs. In this example, SorR1, a Zn(II)₂Cys₆ factor, acts as an activator for the expression of all genes located within the cluster. The second zinc finger TF (SorR2) controls the expression of the *sorR1* gene [86]. Few cases of TFs belonging to the basic leucine zipper (bZIP) family have been reported to act as specific TFs of secondary metabolite pathways. These TFs include ZEB2, SimL, and OtaR1. The latter TF is present in the OTA cluster in *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus carbonarius*, and *Penicillium nordicum*. Its inactivation in *A. ochraceus* leads to the complete inhibition of OTA production [63]. SimL regulates the production of the well-known immunosuppressant drug cyclosporine [62]. The transcripts of genes located within the zearalenone gene cluster were not detected when the *zeb2* gene encoding bZIP was deleted [61,99]. *TqaK*, another gene encoding a bZIP protein, was reported to be located inside the tryptoquialanine gene cluster in *Penicillium aethiopicum*. The deletion of *tqaK* led to tryptoquialanine production equal to only one-twentieth that of the parental strain [87]. An orthologous gene is also present in the genome of *Penicillium digitatum*, another tryptoquialanine-producing species. Thus far, OtaR1 and TqaK are the only bZIP proteins identified to be directly involved in secondary metabolite biosynthesis in *Penicillium*.

2.2. Environmental Signals and Associated Regulators

In the previous section, we reviewed specific TFs described in *Penicillium* that are cluster-specific. However, numerous regulatory elements affected by environmental cues modulate the expression of fungal secondary metabolite clusters and do not reside within the cluster itself. They are considered to be global regulators (Figure 14). Among them, CreA, AreA, Nmc, PacC, Skn7, Yap1, VeA, LaeA, BrlA, PcRFX1, PcFKH1, Pcz1, and NsdD have been mentioned and are discussed in the following.

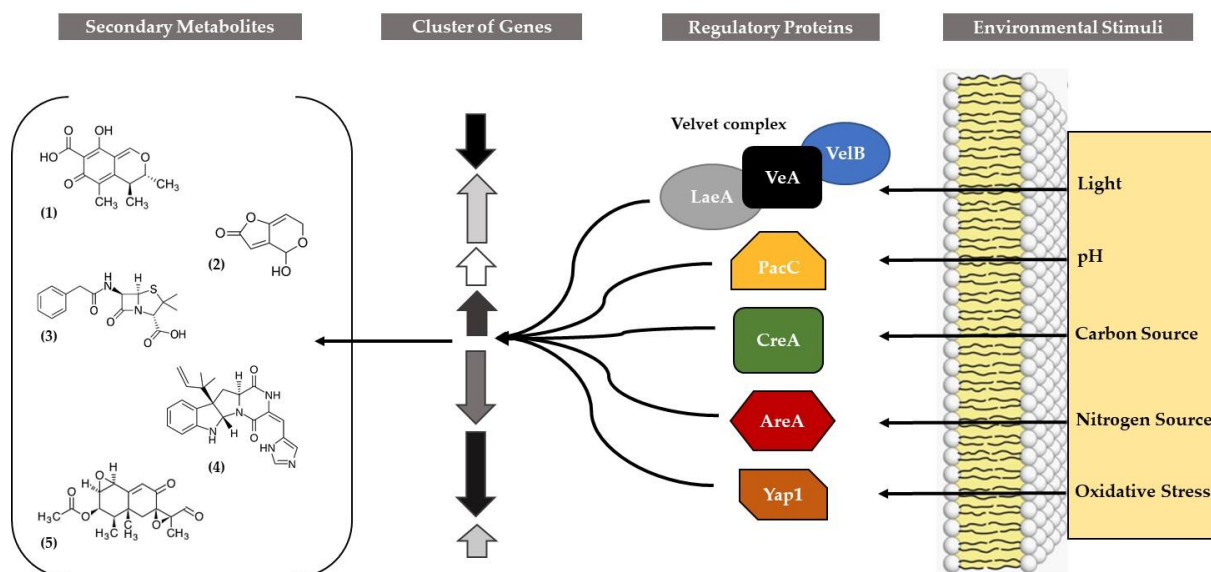


Figure 14. Global regulatory proteins involved in the regulation of gene clusters involved in the production of various secondary metabolites in *Penicillium* (1) citrinin, (2) patulin, (3) penicillin G, (4) roquefortine C, and (5) PR-toxin, adapted from Brakhage [45].

In the fungal kingdom, the synthesis of secondary metabolites is often a response to environmental or ecological changes and is dependent on the developmental stage of the producing species. The activation of a biosynthetic pathway is influenced by the composition of the substrate on which the fungus grows—in particular, the carbon source and the nitrogen source. Glucose and other assimilable sugars can suppress secondary metabolite pathways mediated by **CreA**, a protein displaying two Cys²His² zinc finger domains. For example, the biosynthesis of penicillin in *Penicillium chrysogenum* was shown to be largely regulated by glucose, sucrose and, to a lesser extent, by other sugars (maltose, fructose, and galactose). Cepeda-García et al. [100] showed clear evidence of the involvement of the CreA factor in the catabolic repression of penicillin biosynthesis and the expression of the *pcbAB* gene, encoding the first enzyme of the penicillin pathway in *P. chrysogenum*. The authors applied an RNAi strategy attenuating *creA* gene expression. Transformants expressing small interfering RNAs for *creA* showed greater production of penicillin. By contrast, a recent study showed that the deletion of *creA* in *P. expansum* strains leads to the absence of patulin production in apples [101], although expression of the *pat* genes is increased. Regarding the nitrogen source, a similar regulatory mechanism called nitrogen metabolite repression exists in Ascomycetes. For instance, a concentration of ammonium above 40 mM caused a repression in the expression of *uidA*, a promoterless gene for β -glucuronidase in *Escherichia coli*, when fused to the promoters of *pcbAB* (*acvA*) and *pcbC*, two genes encoding the two first enzymes of the penicillin pathway in *P. chrysogenum* [102]. In *P. griseofulvum* (formerly *P. urticae*), the production of patulin was also affected when ammonium ions were added to the culture medium [103]. On the other hand, the presence of 30 mM ammonium chloride results in a significant decrease in isoepoxydon dehydrogenase (*idh*) and 6-methylsalicylic synthase (*6-msas*) transcripts, key genes in the pathways of patulin biosynthesis [104,105]. This nitrogen metabolite repression is mediated by **AreA**, a Cys²Cys²-type zinc finger TF [31]. This regulatory factor binds to the intergenic region of *acvA-pcbC* [106] in response to nitrogen and mediates the regulation of penicillin biosynthesis in *P. chrysogenum* [107]. The *idh* (*patN*) and *6-msas* (*patK*) genes interact with the NrfA protein, an orthologue of the AreA protein in *P. griseofulvum*, through several putative GATA sites located on their promoter. The *nmc* gene, encoding the AreA orthologous factor, has been characterized in *Penicillium roqueforti*. This protein, which displays at least 94% identity with that of homologous fungal proteins (AreA in *Aspergillus*) [108], is induced and upregulated by nitrogen starvation, but no data regarding its impact on *P. roqueforti* secondary metabolites have already been published.

Another well-known environmental stimulus that induces or represses the secondary metabolism in filamentous fungi is the pH of the substrate. This regulation is mediated by **PacC**, the key factor of pH fungal regulation [109]. This TF displays three putative Cys₂His₂ zinc fingers [110]. In the genus *Aspergillus*, a neutral to alkaline extra-cellular pH is required for the activation of PacC via two proteolytic steps [111]. These steps are mediated by the *pal* (*palA*, *palB*, *palC*, *palF*, and *palI*) pathway [109]. The final mature form of this protein activates the expression of genes expressed under alkaline conditions and, by contrast, represses the transcription of genes expressed under acidic conditions. Many examples of PacC's involvement in the regulation of biosynthetic pathways in *Aspergillus* or *Fusarium* species have been reported in the literature [65,112,113]. Suárez and Peñalva [114] showed that *Penicillium pacC* transcript levels were higher under alkaline than acidic growth conditions and elevated in later stages of growth. The level of the *pcb* transcripts followed the same trend, leading to increased production of penicillin under alkaline pH. Barad et al. [115] also studied the link between ammonia accumulation, the activation of *pacC*, and the synthesis of patulin in *P. expansum*. The authors concluded that an accumulation of ammonia during nutritional limitation in *P. expansum* could lead to a modification of the ambient environmental pH, a signal for the activation of *pacC*, as well as other alkaline induced genes leading to an accumulation of secondary metabolites, such as patulin.

Barad et al. [116] analyzed the role of PacC in the regulation of D-gluconic acid (GLA) production and patulin accumulation in *P. expansum*. On the one hand, their results showed that GLA production plays a role in the activation of patulin production. On the other hand, this study, based on the characterization of *pacC*-RNAi mutants of *P. expansum*, concluded that PacC plays a key role in the regulation of GLA accumulation via the transcriptional regulation of *gox2*, the most important gene involved in GLA production in *P. expansum*. This regulation of GLA production through PacC largely affects patulin accumulation in the mutants. A recent publication reported that the production of patulin is completely inhibited in the null mutant *PeΔpacC* strain when grown at pH > 6.0 [117]. In *P. digitatum*, PacC was reported to regulate the expression of genes encoding polygalacturonase PG2 and pectin lyase PNL1, enzymes both involved in the degradation of the citrus cell wall [118].

Osmotic and oxidative stress are considered to be other environmental cues to which filamentous fungi should respond in order to survive. Most of the relevant knowledge comes from the yeast *S. cerevisiae* and the fungal genus *Aspergillus*. **Skn7**, a TF involved in the osmotic and oxidative stress responses in *S. cerevisiae* [119], has also been identified in *Talaromyces* (formerly *Penicillium*) *marneffeii*. The gene *skn7* from the latter was used to complement a *skn7*-disrupted strain of *S. cerevisiae* and seemed to be involved in the oxidative stress response in the yeast [120]. This result indicates the highly conserved nature of *skn7* between the two organisms. Montibus et al. [121] suggested that *skn7* could be involved in the regulation of fungal secondary metabolism. A recent study seemed to confirm this hypothesis since the deletion of *Afskn7* resulted in a drastic decrease in aflatoxin B1 production in *Aspergillus flavus* [122]. **Yap1**, another TF, coordinates the interplay between oxidative stress and secondary metabolism. In *Aspergillus parasiticus*, the deletion mutant *Δyap1* exhibited an increase in aflatoxin production [123]. The same team later reported that the suppression of the *yap1* orthologous gene led to increased OTA accumulation in *Aspergillus ochraceus* [124]. In *T. marneffeii*, the mutant *ΔyapA*, a *yap1* orthologous gene, was found to be sensitive to oxidative chemicals such as H₂O₂ or menadione and featured growth, germination, and conidiation delays [125]. For the genus *Penicillium*, the only works on orthologues Skn7 and Yap1 are mentioned above; their roles in the secondary metabolism of *T. marneffeii* have not yet been investigated.

The development of filamentous fungi and their ability to produce secondary metabolites is largely influenced by light, as well. A velvet complex has been described in *Aspergillus nidulans*, and the **VeA** (velvet A) factor has been widely studied, as well as many proteins that seem to interact with it, such as VelB (velvet-like B), VosA (viability of spores A), VelC (velvet-like C), and the non-velvet protein **LaeA** (loss of *aflR* expression A), a methyltransferase involved in chromatin remodeling [126]. Depending on the fungal species, VeA is involved in different physiological processes, such as development, asexual and sexual reproduction, secondary metabolism, and virulence. The regulation mediated by this factor depends particularly on light. VeA was first characterized in *A. nidulans*, whose gene encodes a protein

of 573 amino acids with a conserved domain at the N-terminus [127] and a nuclear localization sequence (NLS) [128]. At its C-terminus, a PEST domain (rich in proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T)) is present [129]. This PEST domain is also found in VeA orthologous proteins in *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, and *Neurospora crassa* [130].

Stinnett et al. [128] studied the intracellular localization of VeA. This study demonstrated that this localization is dependent on light. In the dark, VeA is mainly located in the nucleus, whereas in the presence of light, VeA is mainly found in the cytoplasm. In the *veA1* mutant [131], VeA is mostly found in the cytoplasm independently of light. In this mutant, the presence of a mutation on the transcription initiation codon led to a truncated protein where the first 36 amino acids were missing and, therefore, did not have a functional NLS, thus explaining the cytoplasmic localization of VeA. In the same study, it was demonstrated that the transfer of VeA into the nucleus depends on the importin α KapA and that a functional NLS is essential to allow the interaction of these two proteins.

To identify the proteins interacting with VeA, Bayram et al. [127] used the Tandem Affinity Purification (TAP) technique from a strain of *A. nidulans* expressing a VeA protein coupled to a TAP-tag at the C-terminus. In the dark, the proteins VelB, LaeA, and importin α KapA interact with VeA. Conversely, only VelB interacts with VeA in the presence of light. Using the yeast two-hybrid technique, these analyses confirmed the interactions of VeA–VelB and VeA–LaeA; however, no interaction was demonstrated between LaeA and VelB, suggesting that VeA acts as a bridge between these two proteins. In addition, fluorescence assays showed that the VeA–LaeA interaction occurs in the nucleus, while VeA and VelB interact in the nucleus and the cytoplasm. LaeA is located in the nucleus, and its interaction with VeA is nuclear. VelB must, therefore, be able to enter the nucleus despite the absence of NLS in its sequence. Bayram et al. [127] demonstrated that VeA helps VelB to enter the nucleus to form the velvet complex.

The results obtained in the various studies allowed Bayram et al. [127] to propose a mechanism (Figure 15) that coordinates the regulation of sexual development and the production of secondary metabolites in *A. nidulans*. In the dark, the VelB/VeA/LaeA complex controls and induces the epigenetic activity of LaeA, which consequently controls the expression of the genes of the clusters responsible for the synthesis of the secondary metabolites. In the presence of light, this interaction decreases because VeA is retained in the cytoplasm, and LaeA has low activity.

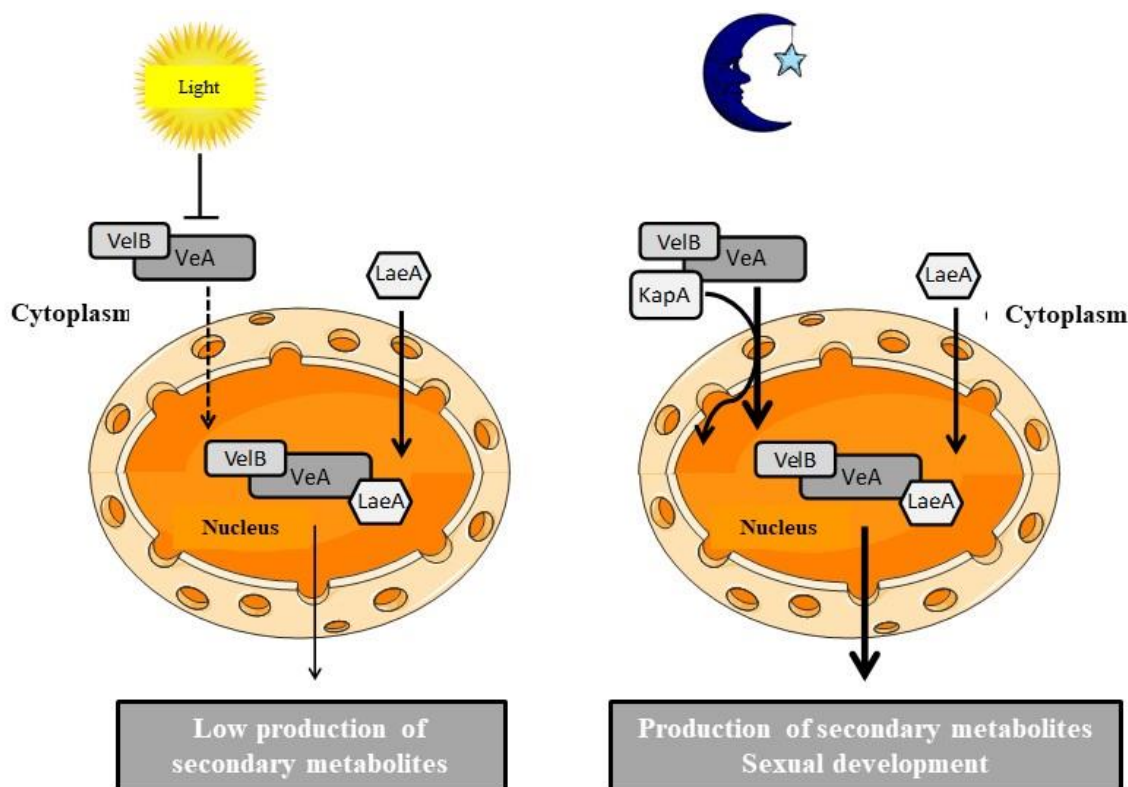


Figure 15. Operating model of the velvet complex in *Aspergillus nidulans* adapted from Bayram et al. [127]. In the presence of light, VeA is retained in the cytoplasm (-----), and LaeA has low activity. In the dark, VeA coupled to VelB is transported in the nucleus by the importin α KapA (→) and the velvet complex is formed with LaeA to activate the production of secondary metabolites and sexual development.

Despite its strong conservation among different fungal species, VeA has different roles, reflecting the diversity of fungal development patterns. Therefore, *veA* has a role in the regulation of secondary metabolism. The expression of genes involved in the synthesis of secondary metabolites is affected by VeA [132–135]. Kato et al. [132] demonstrated that in *A. nidulans*, VeA regulates the expression of genes involved in sterigmatocystin synthesis. Indeed, VeA is necessary for the expression of *aflR*, which encodes the TF specific to the biosynthetic pathway of this mycotoxin [136]. Similarly, the *veA* gene is required for the transcription of *aflR* and *aflJ*, another gene coding for a TF, also located within the aflatoxin/sterigmatocystin cluster in *A. flavus* [137,138]. Other studies revealed that VeA is needed for the synthesis of other secondary metabolites, such as cyclopiazonic acid and aflatrem in *A. flavus* [133], penicillin in *A. nidulans* [132], or trichothecenes in *Fusarium graminearum* [139]. In this last study, FgVe1 was shown to be a positive regulator of the virulence of *F. graminearum*. In *Fusarium verticillioides*, FvVe1 is necessary not only for the production of fumonisins but also for the infection of corn plants by the fungus [140]. In *P. chrysogenum*, *veA* controls penicillin biosynthesis [141]. Recently, it was shown that the disruption of *veA* in *P. expansum* quasi-totally altered patulin and citrinin production when the fungus was grown on the usual mycological media (Malt Extract Agar and Potato Dextrose Agar). This decrease in production is explained by a drastic decrease in the expression of patulin and citrinin genes [142]. This finding was confirmed in vivo, as no patulin was detected when the null mutant was developed in apples. In the same study, an analysis of the impact of VeA on the expression of all secondary metabolism backbone genes in *P. expansum* was performed from the genome of the d1 strain, including PKS, NRPS, terpene synthase, and DMATS genes. The expression analysis showed a positive or negative regulation of 15/35 backbone genes and supports the hypothesis that *P. expansum*'s secondary metabolism is modulated by the transcriptional regulator factor VeA. In a recent study, Li et al. [143] assessed the involvement of the proteins VeA, VelB, VelC, and VosA, belonging to the velvet

family, in the regulation of patulin biosynthesis in *P. expansum*. The absence of VeA and VelB blocked the production of the mycotoxin, whereas the absence of VelC caused a drastic decrease in patulin production. In contrast, deletion of the *vosA* gene had no effect on the capacity of the fungus to synthesize patulin. These findings suggest the lack of involvement of VosA in the biosynthesis of patulin in *P. expansum* in contrast to the other three proteins (VeA, VelB, and VelC) of the velvet complex.

Baba et al. [144] also showed through gene deletion that *veA* plays critical roles in the production of the hypocholesterolemic lovastatin analogue compactin (ML-236B) in *P. citrinum* by controlling the expression of *mlcR*, the pathway-specific activator gene for compactin biosynthesis.

It was also shown that different components of the velvet complex may play opposite roles in the regulation of secondary metabolism. In *P. chrysogenum*, PcVelC, together with the velvet PcVeA (orthologue of VeA in *P. chrysogenum*) and the methyltransferase PcLaeA, induced penicillin production, and, in contrast, PcVelB acted as a repressor [141,145].

Under the conditions tested by Kosalkova et al. [146], *LaeA* controlled some secondary metabolism gene clusters in *P. chrysogenum*. Its overexpression resulted in a four-fold increase in *pcbC* and *penDE* expression, leading to a 25% increase in gene expression in penicillin biosynthesis, while its suppression significantly reduced the expression of these genes. In contrast, the absence of an expression level difference ($\Delta laeA$ vs. wild type (WT)) for the *rpt* gene involved in the second step of the roquefortine biosynthetic pathway suggests that *PclaeA* does not regulate the biosynthesis of roquefortine C. The regulation of the secondary metabolism of *P. expansum* by *laeA* was investigated from two cultures on different media [147]. Of the 54 backbone genes examined, many appeared to be positively regulated by *laeA*, such as those involved in the biosynthesis of roquefortine C, an unknown ETP-like metabolite, and patulin. In *Penicillium oxalicum*, it has been shown that the putative methyltransferase *LaeA* controls, among other things, the expression of some secondary metabolic gene clusters [148]. However, the cluster predicted to be involved in roquefortine C/ meleagrins/oxaline biosynthesis was not affected by the suppression of the *laeA* gene in *P. oxalicum*. The difference observed between these studies regarding *laeA* regulation of the genes involved in the biosynthesis of roquefortine C could be due to the species used and the medium tested.

Zhu et al. [149] demonstrated the role of *laeA* in secondary metabolism regulation, conidial production, and stress responses in *P. digitatum*. The deletion of *PdlaeA* resulted in decreased expression of various secondary metabolite gene clusters, including the *Tq* cluster involved in tryptoquialanine biosynthesis. Deletion of this gene also affected the expression of several regulators of conidiation, including *BrlA*. A comparison between the WT and the null mutant *Pd Δ laeA* strains revealed increased sensitivity of the null mutant strain under alkaline conditions. The loss of *PdlaeA* had no significant effect on the virulence of the null mutant strain. This work showed the involvement of *laeA* in the biosynthesis of several secondary metabolites, as well as the development and the adaptation of *P. digitatum* to its environment.

Yu et al. [150] showed that the overexpression of *LaeA* in the *Penicillium dipodomyis* marine-derived strain YJ-11 leads not only to morphological but also metabolic changes. Overexpression mutants displayed the ability to produce several sorbicillinoids, two of which are new compounds, as well as four known sorbicillin analogues. These results indicate that *LaeA* plays a key role in the activation of cryptic genes that are silent under normal *laeA* expression.

Kumar et al. [151] showed the effects of the intrinsic factors of apples in modulating patulin accumulation and on *laeA* and *pat* gene expression in apples colonized by *P. expansum*. The authors used two apple varieties, Golden Delicious and Granny Smith, which have similar total soluble solid value profiles at the time of ripening but different pH values and malic acid concentrations. These factors differentially affected the expression of *LaeA* along with the expression of the patulin cluster genes and, therefore, patulin accumulation. To understand the complexity of these interactions, *in vitro* studies were performed. These studies proved that sucrose and malic acid concentrations and pH are all involved, in association with chlorogenic acid and epicatechin, in a complex interaction system that modulates the regulation and production of patulin.

Penicillium brocae HDN-12-143 is a fungus isolated from marine sediments that has strong potential for the biosynthesis of secondary metabolites. Wang et al. [152] studied the effect of overexpression of the *laeA* gene on the secondary metabolism of *P. brocae*. This overexpression revealed that four compounds could be isolated, including fumigatin chlorohydrin and a new polyketide compound, iso-fumigatin chlorohydrin. In summary, the results indicate that LaeA can suppress or activate the expression of gene clusters and that its overexpression can induce the production of new secondary metabolites.

In *Aspergillus*, VeA is responsible for the activation or repression of general genes such as *brlA* [134,153]. **BrlA** is a C₂H₂-type zinc finger TF which is part of the central regulatory pathway (CRP) controlling the expression of genes specific to asexual reproduction. The conformation of *brlA* is complicated and comprises two overlapping transcription units, *brlA α* and *brlA β* [154]. Expression of the *brlA* gene was studied in *P. oxalicum* strains, initially identified as *Penicillium decumbens*, by Qin et al. [155], and the expression levels of 7/28 gene clusters of secondary metabolism were regulated in a Δ *brlA* deletion strain. The cluster involved in the roquefortine C/meleagrins/oxaline biosynthetic pathway was downregulated. In a *P. chrysogenum* *brlA*-deficient mutant, the production of penicillin V was not affected, whereas a reduction of almost 99% was determined via HPLC analysis accompanied by a drastic downregulation of the expression of penicillin biosynthetic genes in a *stuA*-deficient strain [156]. Moreover, the deletion of *laeA* reduced the conidiation in *P. oxalicum*, and the expression of *brlA* was downregulated [148]. A recent study in *P. expansum* showed that the *brlA* gene not only affects the stage of conidiation of the fungus but also affects the biosynthesis of secondary metabolites. Zetina-Serrano et al. [157] showed that the suppression of *brlA* results in a strain devoid of conidia and that the production of communesins and derivatives was drastically decreased, whereas the production of chaetoglobosins and derivatives increased. Neither patulin nor citrinin production was affected by the suppression of *brlA*.

PcRFX1 is a TF that was characterized in *P. chrysogenum* by Domínguez-Santos et al. [158]. PcRFX1 is the orthologue of the regulatory proteins CPCR1 and RFXA in *Acremonium chrysogenum* and *T. marneffei*, respectively. Knockdown and overexpression techniques of the *PcRfx1* gene have proven that PcRFX1 regulates *pcbAB*, *pcbC*, and *penDE* transcription and thereby controls penicillin biosynthesis. PcRFX1 was also suggested to be involved in the control of the pathways of primary metabolism.

PcFKH1, another TF of the winged-helix family, also positively regulates penicillin biosynthesis in *P. chrysogenum* by binding to the *pcbC* promoter, interacting with the promoter region of the *penDE* gene and controlling other genes such as *phlA* and *ppt* encoding phenylacetyl CoA ligase and phosphopantetheinyl transferase [159].

The *pcz1* gene (*Penicillium* C6 zinc domain protein 1), encoding a Zn(II)₂Cys₆ protein and controlling the growth and development processes of the fungus, has also been described in *P. roqueforti*. It was suggested to participate in the physiological processes in this fungus and plays a key role in regulating its secondary metabolism [160,161]. The silencing of *pcz1* in *P. roqueforti* resulted in the downregulation of the *brlA*, *abaA*, and *wetA* genes of the CRP [160]. In *pcz1* downregulated strains, the production of the metabolites roquefortine C, andrastin A, and mycophenolic acid was severely reduced; however, when *pcz1* was overexpressed, only mycophenolic acid was overproduced, and levels of roquefortine C and andrastin A were decreased [161].

Finally, the *PoxnsdD* gene of *P. oxalicum* was characterized by He et al. [162]. This gene is an orthologue of the *nsdD* gene (initially isolated in *A. nidulans*) encoding a GATA-type zinc finger TF that was proven to be involved in the production of secondary metabolites. In the *Pox Δ nsdD* strain, the 230 differentially expressed genes identified covered 69 putative BGCs. Among them, 11 were predicted to produce aspyridone, emericellin, citrinin, leucinostatins, roquefortine C/meleagrins, beauvericin, cytochalasin, malbrancheamide, and viridicatumtoxin.

2.3. Signal Transduction Pathways

In general, fungi present a very dynamic and structured cell wall. During the cell cycle, organisms need to adapt quickly to changes under environmental conditions and imposed stresses and thus

regulate the composition and structural organization of their cell wall [163–165]. All these factors influence the biosynthesis of secondary metabolites in the fungus. Numerous signaling pathways activate and regulate the growth and differentiation of filamentous fungi and initiate secondary metabolite biosynthesis under specific conditions. These signaling pathways sense and transduce signals external to TFs that, in turn, activate the expression of genes that could be involved in the biosynthesis of certain secondary metabolites. The cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA), calcineurin/calmodulin, TOR, and mitogen-activated protein kinase are the most studied pathways [34]. The production of many secondary metabolites has been associated with one of these transduction signals and specific active molecules. Among the different signaling pathways listed, we focus on those that affect only the secondary metabolism of *Penicillium*, starting with the cAMP pathway.

2.3.1. cAMP Pathways

Heterotrimeric G proteins are considered to be important components of these signal transduction pathways. They can integrate a variety of signals and then transduce them to downstream signaling cascades. Most filamentous fungi have three $G\alpha$ proteins belonging to classes I, II, or III [166]. $G\alpha$ subunits belonging to class I are involved in many aspects related not only to the development of the fungus or its pathogenicity but also its secondary metabolism, which is not the case for $G\alpha$ subunits of classes II and III. The deletion of genes encoding class II $G\alpha$ proteins showed negligible effects on fungal metabolism [167,168], while those of class III are involved in fungal development and pathogenicity [169–171]. Alterations have been observed in the secondary metabolism of different fungi, including *P. chrysogenum* [172] and *T. marneffeii* [173]. The *pga1* gene, encoding subunits of subgroup I $G\alpha$ protein in *P. chrysogenum*, has been shown to affect the production of three secondary metabolites: penicillin, chrysogenin, and roquefortine C. The deletion of *pga1* induces a decrease in the production of roquefortine C and penicillin by regulating the expression of *pcbAB*, *pcbC*, and *penDE*, the three structural biosynthetic genes of the penicillin cluster. Chrysogenin biosynthesis is enhanced, and roquefortine and penicillin biosynthesis is upregulated by the presence of a dominant activating *pga1* (G42R) allele or a constitutively active Pga1 [172]. Based on a proteomic analysis, Carrasco-Navarro et al. [174] suggested that Pga1 signaling affects penicillin biosynthesis by acting on the primary metabolism pathways that are also involved in cysteine, ATP, and NADPH biosynthesis. They also propose a model for the Pga1-mediated signal transduction pathway.

2.3.2. The Osmostress Response Pathway

Usually, inhibition of the HOG (high osmolarity glycerol) signaling pathway negatively affects the production of metabolites; in other words, challenging osmotic conditions activate the cascade of the HOG MAP kinase signal, thereby activating several osmo-regulated genes or downstream TFs by phosphorylation. In their study, Stoll et al. [175] showed that NaCl induced production of OTA in correlation with the phosphorylation status of the HOG MAP kinase in *P. nordicum* and *Penicillium verrucosum*. The activation of HOG phosphorylation and the concomitant OTA biosynthesis suggest a link between the two processes and that this regulation may be mediated by the HOG MAP kinase signal transduction pathway. This was confirmed by inactivating the *hog* gene in *P. verrucosum*, making the fungus unable to produce OTA under high NaCl conditions. The biosynthesis of citrinin, another *P. verrucosum* toxin, was not affected. This could be explained by the subsequent work of Schmidt-Heydt et al. [176], which showed the impact of high oxidative stress conditions on citrinin biosynthesis. Indeed, by increasing Cu^{2+} concentrations in a growth medium, *P. verrucosum* shifts the biosynthesis of its secondary metabolism from OTA to citrinin. Increasing amounts of external cAMP reduce citrinin biosynthesis depending on the concentration chosen and suggest that citrinin biosynthesis is regulated by a cAMP/PKA signaling pathway.

2.4. Epigenetic Regulation

As previously discussed, *Penicillium* species, including other fungi, produce a set of bioactive secondary metabolites that are not essential to their survival. Genes for biosynthesis and the regulation of secondary metabolites in fungi are not evenly distributed over the genomes and tend to be subtelomerically located [177]. The manipulation of global epigenetic regulators has contributed to the study of many unknown secondary metabolites, and many histone modifications have been associated with the regulation of secondary metabolism gene clusters [178,179]. The epigenetic phenomena that can occur are reversible, and many changes in the gene expression levels of the fungus do not alter the DNA sequence and can occur throughout the fungus life cycle. Fungal epigenetic regulation involves mainly histone modifications, such as methylation, acetylation, and sumoylation. Histone proteins are the primary protein components of chromatin and, through their modifications, regulation can be limited to a specific region of the chromosome and, therefore, affect some genes. This supports the advantage of grouping secondary metabolism genes into clusters. The first involvement of the epigenetic regulation of secondary metabolites described in the literature was that of the *A. nidulans* histone deacetylase coded by *hdaA*, an orthologue of the histone deacetylase *hdaA1* gene of *S. cerevisiae*. Deletion of this gene caused the activation of two secondary metabolite gene clusters. In the same paper, treatment of the *P. expansum* culture with trichostatin A, a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, resulted in the overproduction of several non-determined metabolites [179].

In *P. chrysogenum*, *hdaA* appears to be a key regulator of the secondary metabolism of the fungus. Deletion of *hdaA* induced a significant effect on the expression of numerous PKS and NRPS-encoding genes. A downregulation of the NRPS encoded gene associated with the BGC of chrysogine was also observed. This observation was confirmed by Ding et al. [180]. In parallel, transcriptional activation of the BGC of sorbicillinoids occurs, which is associated with the detection of a new compound produced only under these conditions. These results obtained by Guzman-Chavez et al. [181] suggest the existence of crosstalk between BGCs. In a recent study, the disruption of *hdaA* led to an upregulation of the meleagrins/roquefortine C biosynthesis gene cluster, accompanied by higher meleagrins production [180].

Akiyama et al. [182] investigated the involvement of *clr3* in *Penicillium brasilianum* physiology. **Clr3** is a homologue of the class 2 histone deacetylase *hda1* in *S. cerevisiae*. On the one hand, the deletion of *clr3* resulted in decreased fungal growth under oxidative stress conditions. In addition, various secondary metabolites, such as austin-related meroterpenoids, brasiliamides, cyclodepsipeptides, and mycotoxins, including verruculogen and penicillic acid, were downregulated in the null mutant Δ *clr3* strain. On the other hand, epigenetic modulation was studied using suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), a histone deacetylase inhibitor, and nicotinamide. These treatments also resulted in reduced secondary metabolite biosynthesis. Together, these findings suggest that *clr3* plays a key role in the regulation of secondary metabolism in *P. brasilianum*.

By growing *Penicillium variable* on a maltose medium in the presence of 5-azacytidine (a DNA methyltransferase inhibitor), varitatin A synthesis was induced [183]. In addition, by growing it on a potato-based medium in the presence of SAHA, seven polyketides were induced, including three known wortmannilactones (E, F, and H), as well as new varilactones (A-B) and wortmannilactones (M-N) [184]. In cultures treated with 50 μ M of 5-azacytidine, *Penicillium citreonigrum* formed exudates, which are droplets rich in primary and secondary metabolites, inorganic substances, and proteins/enzymes and are known as guttates. These exudates were very rich in different compounds compared to the control. Indeed, 5-azacytidine induced the formation of six azaphilones (fungal metabolites with diverse biological activities), pencolide, and two new meroterpenes [185]. The addition of 5-azacytidine to the culture medium of *Penicillium funiculosum* also altered the metabolic profiles of this fungus [186]. Two new prenyleudesmane diterpenoids were extracted from the culture and exhibited cytotoxic and antibacterial activities. *Eupenicillium* sp. LG41, an endophytic fungus, was exposed to an epigenetic modulation using nicotinamide, a NAD⁺-dependent HDAC inhibitor [187]. This led to the production of many compounds: eupenicinols C and D, along with eujavanicol A and eupenicinicol A. El-Hawary et al. [188] showed that cultures of a marine-derived strain of *Penicillium brevicompactum* exposed to nicotinamide and sodium butyrate result in the production of phenolic

metabolites. In the presence of nicotinamide, many compounds, including *p*-anisic acid, benzyl anisate, syringic acid, and sinapic acid, were isolated and identified. Sodium butyrate also enhanced the production of anthranilic acid and ergosterol peroxide.

In one of the many studies to explore compounds with innovative structures and biological activities from endophytes of ancestral Chinese medicine, Guo et al. [189] used chemical epigenetic manipulation to evaluate the secondary metabolism of the *Penicillium herquei* strain, recovered from the fruiting body of *Cordyceps sinensis*. This latter has been used for thousands of years by the Chinese to boost longevity, endurance, and vitality. The DNA methyltransferase inhibitor, 5-aza-2-deoxycytidine, affected the production of secondary metabolites, purifying three previously unpublished polyketides with a pyran-2-one scaffold.

Ying et al. [190] showed that cultures of *Penicillium* sp. HS-11, isolated from the medicinal plant *Huperzia serrata*, produced two compounds in the presence of SAHA: 4-epipenicillone B and (R)-(+)-chrysogine, which are both absent under normal laboratory conditions.

The addition of 500 μ M of suberoyl bis-hydroxamic acid, a Zn(II)-type or NAD⁺-dependent HDAC inhibitor, and 100 μ M of nicotinamide (an NAD⁺-dependent HDAC inhibitor) to a culture of *Penicillium* sp. isolated from leaves of *Catharanthus roseus* improved the production of citreoviripyrone A and citreomontanin. In addition, nicotinamide enhanced the production of (-)-citreoviridin [191]. Xiong et al. [192] explored the role of the high-mobility group box protein, **PoxHmbB**, involved in chromatin organization and identified in *P. oxalicum*. The authors observed that conidiation and hyphae growth were delayed in a mutant *Pox Δ hmbB* strain. *PoxhmbB* regulated the expression of genes encoding plant biomass-degrading enzymes and other genes involved in conidiation. Although the suppression of the orthologous gene resulted in an absence of sterigmatocystin production in *A. nidulans* [193], the involvement of this protein in the secondary metabolism of *Penicillium* has not yet been investigated.

Tannous et al. [194] evaluated the involvement of the epigenetic reader *SntB* in the pathogenicity and secondary metabolism of *P. expansum*. Firstly, the results showed that the deletion of *sntB* caused numerous phenotypic changes in the plant pathogen. In the absence of *sntB*, *P. expansum* showed delayed vegetative growth, reduced conidiation, an accelerated germination rate, and decreased virulence in apples. Secondly, the data showed that *sntB* played a key role in regulating secondary metabolism, especially patulin and citrinin biosynthesis. In addition, the role of *sntB* in the positive regulation of three TFs of secondary metabolism and virulence (*LaeA*, *CreA*, and *PacC*) was demonstrated. Finally, this study revealed the downregulation of *sntB* in response to environmental factors such as low temperature and high CO₂ levels, conditions to which apples are subjected during storage. These findings suggest a possible method for integrating these epigenetic control strategies to fight post-harvest fruit rot.

Finally, the chromatin regulation of small molecule gene clusters allowed the specific control of secondary metabolism gene clusters and permitted filamentous fungi to modify chemical diversity and successfully exploit environmental resources. Epigenetic regulation is considered a promising strategy for investigating unknown secondary metabolite clusters, particularly because under certain laboratory culture conditions, many clusters can remain silent, making it difficult to elucidate their functions and regulatory mechanisms [195].

3. Conclusion

Fungal secondary metabolism is very broad, and this review focused on metabolism regulated in the *Penicillium* genus. Given the diversity of secondary metabolites, their key roles as virulence and pathogenicity factors, and their great medical and agricultural interest, further research should be conducted on these metabolites. This review highlighted how the production of these secondary metabolites is controlled and regulated. It discussed the different levels of regulation of secondary metabolites, including specific regulators, global TFs, transduction signaling pathways, and epigenetic regulation, as well as the combination of many different parameters affecting the biosynthesis pathways of metabolites. Many TFs that affect the expression of genes involved in secondary metabolism seem to belong to the category of zinc-binding proteins. *LaeA* and the velvet complex proteins are considered

to be global regulators and are able to control many clusters at the same time. Although much is known about these global TFs and their regulatory proteins, more research is needed to explore the details that link them to the transcription of genes involved in secondary metabolite biosynthetic pathways. This would help us to better understand the molecular mechanisms underlying this complex regulatory network. The analysis of a large number of works related to secondary metabolism regulation in filamentous fungi revealed great complexity. This complexity is suggested by the observation of inter-species differences in the impact of a given TF gene deletion on the same biosynthetic pathway.

The study of the regulation of secondary metabolite biosynthesis in *Penicillium* is much less advanced than that in *Aspergillus*, and some orthologous genes already studied in *Aspergillus* (including *rtfA*, *cpsA*, *rmtA*, *mtfA*) should be investigated in *Penicillium* sp.

Author Contributions: Writing—original draft preparation, C.H.A, C.Z.-S., N.T., S.L., and O.P.; writing—review and editing, A.K., A.A., I.P.O., S.L., and O.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: C.H.A. was supported by a doctoral fellowship funded by the Belgian Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food and la Région Occitanie (France) under Grant 15050427. C.Z.-S. was supported by a doctoral fellowship funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) México, grant number CVU CONACYT 623107. N.T. was supported by a doctoral fellowship funded by The National Council for Scientific Research of Lebanon (CNRS-L). This research was funded by CASDAR AAP RT 2015, grant number 1508, by French National Research Agency, grant numbers ANR-15-CE21-0010-01 NEWMYCO and ANR-17-CE21-0008 PATRISK, and by International Cooperation Program CAPES/COFECUB (project number Sv 947/19).

Acknowledgments: We thank Selma P. Snini of the University of Toulouse (Toulouse, France) for Figure 15.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

BGC	Biosynthetic Gene Cluster
bZIP	Basic leucine zipper
CRP	Central regulatory pathway
DMATS	Dimethylallyl tryptophan synthase
ETP	Epipolythiodioxopiperazine
HDAC	Histone deacetylase
HOG	High osmolarity glycerol
NLS	Nuclear localization sequence
NRPS	Non-ribosomal peptide synthetase
OTA	Ochratoxin A
PKS	Polyketide synthase
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid
TAP	Tandem Affinity Purification
TC	Terpene cyclase
TF	Transcription factor
WT	Wild Type

References

- Hawksworth, D.L. The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.* **1991**, *95*, 641–655, doi:10.1016/S0953-7562(09)80810-1.
- Hawksworth, D.L.; Lücking, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol. Spectrum* **2017**, *5*, FUNK-0052-2016, doi:10.1128/microbiolspec.funk-0052-2016.
- Cho, H.S.; Hong, S.B.; Go, S.J. First report of *Penicillium brasilianum* and *P. daleae* isolated from soil in Korea. *Mycobiology* **2005**, *33*, 113–117, doi:10.4489/myco.2005.33.2.113.

- Bazioli, J.M.; Amaral, L.D.S.; Fill, T.P.; Rodrigues-Filho, E. Insights into *Penicillium brasilianum* secondary metabolism and its biotechnological potential. *Molecules* **2017**, *22*, 858–880, doi:10.3390/molecules22060858.
- Houbraken, J.; Kocsubé, S.; Visagie, C.M.; Yilmaz, N.; Wang, X.C.; Meijer, M.; Kraak, B.; Hubka, V.; Samson, R.A.; Frisvad, J.C. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): an overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Stud. Mycol.* **2020**, *95*, 5–169, doi:10.1016/j.simyco.2020.05.002.
- Frisvad, J.C.; Samson, R.A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: a guide to identification of food and air-borne terverticillate penicillia and their mycotoxins. *Stud. Mycol.* **2004**, *49*, 1–174.
- Pitt, J.I.; Hocking, A.D. Fungi and food spoilage. In *Fungi and Food Spoilage*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, **2009**; pp. 243–245.
- Samson, R.A.; Houbraken, J.; Thrane, U.; Frisvad, J.C.; Andersen, B. *Food and indoor fungi*. CBS-KNAW, Utrecht, the Netherlands, **2010**; 390 p.
- Frisvad, J.C.; Smedsgaard, J.; Larsen, T.O.; Samson, R.A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Mycology* **2004**, *49*, 201–241.
- Chain, E.; Florey, H.W.; Gardner, A.D.; Heatley, N.G.; Jennings, M.A.; Orr-Ewing, J.; Sanders, A.G. Penicillin as a chemotherapeutic agent. *The Lancet* **1940**, *236*, 226–228, doi:10.1016/S0140-6736(01)08728-1.
- Abraham, E.P.; Gardner, A.D.; Chain, E.; Heatley, N.G.; Fletcher, C.M.; Jennings, M.A.; Florey, H.W.; Adelaide, M.B. Further observations on penicillin. *The Lancet* **1941**, *238*, 177–189, doi:10.1016/S0140-6736(00)72122-2.
- Thom, C. Mycology presents penicillin. *Mycol. Soc. Am.* **1945**, *37*, 460–475, doi:10.1080/00275514.1942.12020904.
- Rančić, A.; Soković, M.; Karioti, A.; Vukojević, J.; Skaltsa, H. Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2006**, *22*, 80–84, doi:10.1016/j.etap.2005.12.003.
- Lucas, E.M.F.; De Castro, M.C.M.; Takahashi, J.A. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* van Beyma. *Braz. J. Microbiol.* **2007**, *38*, 785–789, doi:10.1590/S1517-83822007000400036.
- Nicoletti, R.; Lopez-Gresa, M.P.; Manzo, E.; Carella, A.; Ciavatta, M.L. Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. *Mycopathologia* **2007**, *163*, 295–301, doi:10.1007/s11046-007-9015-x.
- Göhr, A.; Zeeck, A. Secondary metabolites by chemical screening. 9 decarestrictines, a new family of inhibitors of cholesterol biosynthesis from *Penicillium*. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 66–73, doi:10.7164/antibiotics.45.66.
- Oswald, I.P.; Coméra, C. Immunotoxicity of mycotoxins. *Rev. Méd. Vét.* **1998**, *149*, 585–590.
- Rho, M.C.; Lee, H.S.; Chang, K.T.; Song, H.Y.; Kwon, O.E.; Lee, S.W.; Ko, J.S.; Hong, S.G.; Kim, Y.K. Phenylpyropene C, a new inhibitor of Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Penicillium griseofulvum* F1959. *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 211–214, doi:10.7164/antibiotics.55.211.
- Kwon, O.E.; Rho, M.C.; Song, H.Y.; Lee, S.W.; Chung, M.Y.; Lee, J.H.; Kim, Y.H.; Lee, H.S.; Kim, Y.K. Phenylpyropene A and B, new inhibitors of Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Penicillium griseofulvum* F1959. *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 1004–1008, doi:10.7164/antibiotics.55.1004.
- Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. Influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226–236.
- Geisen, R. Molecular monitoring of environmental conditions influencing the induction of ochratoxin A biosynthesis genes in *Penicillium nordicum*. *Mol. Nutr. Food Res.* **2004**, *48*, 532–540, doi:10.1002/mnfr.200400036.

- Schmidt-Heydt, M.; Geisen, R. A microarray for monitoring the production of mycotoxins in food. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *17*, 131–140, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.014.
- Schmidt-Heydt, M.; Magan, N.; Geisen, R. Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**, *284*, 142–149, doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01182.x.
- Khan, A.A.; Bacha, N.; Ahmad, B.; Lutfullah, G.; Farooq, U.; Cox, R.J. Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2014**, *4*, 859–870, doi:10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0230.
- Keller, N.P.; Turner, G.; Bennett, J.W. Fungal secondary metabolism - From biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 937–947, doi:10.1038/nrmicro1286.
- Boettger, D.; Hertweck, C. Molecular diversity sculpted by fungal PKS-NRPS hybrids. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 28–42, doi:10.1002/cbic.201200624.
- Tsunematsu, Y.; Ishikawa, N.; Wakana, D.; Goda, Y.; Noguchi, H.; Moriya, H.; Hotta, K.; Watanabe, K. Distinct mechanisms for spiro-carbon formation reveal biosynthetic pathway crosstalk. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 818–825, doi:10.1038/nchembio.1366.
- Osborn, A. Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends Genet.* **2010**, *26*, 449–457, doi:10.1016/j.tig.2010.07.001.
- Keller, N.P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 167–180, doi:10.1038/s41579-018-0121-1.
- Reverberi, M.; Ricelli, A.; Zjalic, S.; Fabbri, A.A.; Fanelli, C. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 899–911, doi:10.1007/s00253-010-2657-5.
- Tudzynski, B. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 656, doi:10.3389/fmicb.2014.00656.
- Merhej, J.; Richard-Forget, F.; Barreau, C. Regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium*: recent advances and new insights. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91*, 519–528, doi:10.1007/s00253-011-3397.
- Brakhage, A.A.; Spröte, P.; Al-Abdallah, Q.; Gehrke, A.; Plattner, H.; Tüncher, A. Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. *Adv. Biochem. Engineer. Biotechnol.* **2004**, *88*, 45–90, doi:10.1007/b99257.
- Macheleidt, J.; Mattern, D.J.; Fischer, J.; Netzker, T.; Weber, J.; Schroeckh, V.; Valiante, V.; Brakhage, A.A. Regulation and role of fungal secondary metabolites. *Annu. Rev. Genet.* **2016**, *50*, 371–392, doi:10.1146/annurev-genet-120215-035203.
- Alkhayyat, F.; Yu, J.H. Upstream regulation of mycotoxin biosynthesis. *Adv. Appl. Microbiol.* **2014**, *86*, 251–278, doi:10.1016/B978-0-12-800262-9.00005-6.
- Lee, M.K.; Kwon, N.J.; Lee, I.S.; Jung, S.; Kim, S.C.; Yu, J.H. Negative regulation and developmental competence in *Aspergillus*. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28874, doi:10.1038/srep28874.
- Lind, A.L.; Smith, T.D.; Saterlee, T.; Calvo, A.M.; Rokas, A. Regulation of secondary metabolism by the velvet complex is temperature-responsive in *Aspergillus*. *G3* **2016**, *6*, 4023–4033, doi:10.1534/g3.116.033084.
- Pfannenstiel, B.T.; Keller, N.P. On top of biosynthetic gene clusters: how epigenetic machinery influences secondary metabolism in fungi. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 107345, doi:10.1016/j.biotechadv.2019.02.001.
- Tannous, J.; El Khoury, R.; Snini, S.P.; Lippi, Y.; El Khoury, A.; Atoui, A.; Lteif, R.; Oswald, I.P.; Puel, O. Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from *Penicillium expansum*. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *189*, 51–60, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.028.
- Ballester, A.R.; Marcet-Houben, M.; Levin, E.; Sela, N.; Selma-Lázaro, C.; Carmona, L.; Wisniewski, M.; Droby, S.; González-Candelas, L.; Gabaldón, T. Genome, transcriptome, and functional analyses of *Penicillium expansum*

- provide new insights into secondary metabolism and pathogenicity. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **2015**, *28*, 232–248, doi:10.1094/MPMI-09-14-0261-FI.
- He, Y.; Cox, R.J. The molecular steps of citrinin biosynthesis in fungi. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 2119–2127, doi:10.1039/c5sc04027b.
- Grijseels, S.; Pohl, C.; Nielsen, J.C.; Wasil, Z.; Nygård, Y.; Frisvad, J.C.; Nielsen, K.F.; Workman, M.; Larsen, T.O.; Driessen, A.J.M.; et al. Identification of the decumbenone biosynthetic gene cluster in *Penicillium decumbens* and the importance for production of calbistrin. *Fungal Biol. Biotechnol.* **2018**, *5*, 18, doi:10.1186/s40694-018-0063-4.
- Todd, R.B.; Andrianopoulos, A. Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)2Cys6 binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genet. Biol.* **1997**, *21*, 388–405, doi:10.1006/fgbi.1997.0993.
- MacPherson, S.; Larochelle, M.; Turcotte, B. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 583–604, doi:10.1128/mmbr.00015-06.
- Brakhage, A.A. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 21–32, doi:10.1038/nrmicro2916.
- Yin, W.; Keller, N.P. Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *J. Microbiol.* **2011**, *49*, 329–339, doi:10.1007/s12275-011-1009-1.
- Bechet, J.; Greenson, M.; Wiame, J.M. Mutations affecting the repressibility of arginine biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **1970**, *12*, 40–47, doi:10.1111/j.1432-1033.1970.tb00817.x.
- Messenguy, F.; Dubois, E. The yeast ARGR1 regulatory protein has homology with various RNases and DNA binding proteins. *Mol. Gen. Genet.* **1988**, *211*, 102–105, doi:10.1007/BF00338399.
- Strich, R.; Surosky, R.T.; Steber, C.; Dubois, E.; Messenguy, F.; Esposito, R.E. UME6 is a key regulator of nitrogen repression and meiotic development. *Genes Dev.* **1994**, *8*, 796–810, doi:10.1101/gad.8.7.796.
- Rubin-Bejerano, I.; Mandel, S.; Robzyk, K.; Kassir, Y. Induction of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on conversion of the transcriptional repressor Ume6 to a positive regulator by its regulated association with the transcriptional activator Ime1. *Mol. Cell Biol.* **1996**, *16*, 2518–2526, doi:10.1128/mcb.16.5.2518.
- Brown, D.W.; Yu, J.H.; Kelkar, H.S.; Fernandes, M.; Nesbitt, T.C.; Keller, N.P.; Adams, T.H.; Leonard, T.J. Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 1418–1422, doi:10.1073/pnas.93.4.1418.
- Chang, P.K.; Bhatnagar, D.; Cleveland, T.E.; Bennett, J.W. Sequence variability in homologs of the aflatoxin pathway gene *aflR* distinguishes species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 40–43, doi:10.1128/aem.61.1.40-43.1995.
- Ehrlich, K.C.; Montalbano, B.G.; Cary, J.W. Binding of the C6-zinc cluster protein, AFLR, to the promoters of aflatoxin pathway biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus*. *Gene* **1999**, *230*, 249–257, doi:10.1016/S0378-1119(99)00075-X.
- Fernandes, M.; Keller, N.P.; Adams, T.H. Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AfLR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **1998**, *28*, 1355–1365, doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00907.x.
- Yu, J.H.; Butchko, R.A.E.; Fernandes, M.; Keller, N.P.; Leonard, T.J.; Adams, T.H. Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene *aflR* from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. *Curr. Genet.* **1996**, *29*, 549–555, doi:10.1007/BF02426959.
- Lebar, M.D.; Cary, J.W.; Majumdar, R.; Carter-Wientjes, C.H.; Mack, B.M.; Wei, Q.; Uka, V.; De Saeger, S.; Diana Di Mavungu, J. Identification and functional analysis of the aspergillitic acid gene cluster in *Aspergillus flavus*. *Fungal Genet. Biol.* **2018**, *116*, 14–23, doi:10.1016/j.fgb.2018.04.009.

- Bok, J.W.; Chung, D.W.; Balajee, S.A.; Marr, K.A.; Andes, D.; Nielsen, K.F.; Frisvad, J.C.; Kirby, K.A.; Keller, N.P. GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 6761–6768, doi:10.1128/IAI.00780-06.
- Fox, E.M.; Gardiner, D.M.; Keller, N.P.; Howlett, B.J. A Zn(II)2Cys6 DNA binding protein regulates the sirodesmin PL biosynthetic gene cluster in *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genet. Biol.* **2008**, *45*, 671–682, doi:10.1016/j.fgb.2007.10.005.
- Lim, F.Y.; Won, T.H.; Raffa, N.; Baccile, J.A.; Wisecaver, J.; Rokas, A.; Schroeder, F.C.; Keller, N.P. Fungal isocyanide synthases and xanthocillin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *MBio* **2018**, *9*, e00785-18, doi:10.1128/mBio.00785-18.
- Wiemann, P.; Guo, C.-J.; Palmer, J.M.; Sekonyela, R.; Wang, C.C.C.; Keller, N.P. Prototype of an intertwined secondary metabolite supercluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 17065–17070, doi:10.1073/pnas.1313258110.
- Kim, J.E.; Son, H.; Lee, Y.W. Biosynthetic mechanism and regulation of zearalenone in *Fusarium graminearum*. *JSM Mycotoxins* **2018**, *68*, 1–6, doi:10.2520/myco.68-1-2.
- Yang, X.; Feng, P.; Yin, Y.; Bushley, K.; Spatafora, J.W.; Wang, C. Cyclosporine biosynthesis in *Tolypocladium inflatum* benefits fungal adaptation to the environment. *MBio* **2018**, *9*, e01211-18, doi:10.1128/mBio.01211-18.
- Wang, Y.; Wang, L.; Wu, F.; Liu, F.; Wang, Q.; Zhang, X.; Selvaraj, J.N.; Zhao, Y.; Xing, F.; Yin, W.-B.; et al. A consensus ochratoxin A biosynthetic pathway: insights from the genome sequence of *Aspergillus ochraceus* and a comparative genomic analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, e01009-18, doi:10.1128/aem.01009-18.
- Abe, Y.; Suzuki, T.; Ono, C.; Iwamoto, K.; Hosobuchi, M.; Yoshikawa, H. Molecular cloning and characterization of an ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster in *Penicillium citrinum*. *Mol. Genet. Genomics* **2002**, *267*, 636–646, doi:10.1007/s00438-002-0697-y.
- Wiemann, P.; Willmann, A.; Straeten, M.; Kleigrew, K.; Beyer, M.; Humpf, H.U.; Tudzynski, B. Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Mol. Microbiol.* **2009**, *72*, 931–946, doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06695.x.
- Wight, W.D.; Kim, K.H.; Lawrence, C.B.; Walton, J.D. Biosynthesis and role in virulence of the histone deacetylase inhibitor depudecin from *Alternaria brassicicola*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2009**, *22*, 1258–1267, doi:10.1094/MPMI-22-10-1258.
- Brown, D.W.; Butchko, R.A.E.; Busman, M.; Proctor, R.H. The *Fusarium verticillioides* FUM gene cluster encodes a Zn(II)2Cys6 protein that affects FUM gene expression and fumonisin production. *Eukaryot. Cell* **2007**, *6*, 1210–1218, doi:10.1128/EC.00400-06.
- Flaherty, J.E.; Woloshuk, C.P. Regulation of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides* by a zinc binuclear cluster-type gene, ZFR1. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 2653–2659, doi:10.1128/AEM.70.5.2653.
- Chen, H.; Lee, M.H.; Daub, M.E.; Chung, K.R. Molecular analysis of the cercosporin biosynthetic gene cluster in *Cercospora nicotianae*. *Mol. Microbiol.* **2007**, *64*, 755–770, doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05689.x.
- Kim, J.E.; Jin, J.; Kim, H.; Kim, J.C.; Yun, S.H.; Lee, Y.W. GIP2, a putative transcription factor that regulates the aurofusarin biosynthetic gene cluster in *Gibberella zeae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 1645–1652, doi:10.1128/AEM.72.2.1645-1652.2006.
- Shimizu, T.; Kinoshita, H.; Nihira, T. Identification and in vivo functional analysis by gene disruption of *ctnA*, an activator gene involved in citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 5097–5103, doi:10.1128/AEM.01979-06.
- Huang, X.; Li, H.M. Cloning and bioinformatic analysis of lovastatin biosynthesis regulatory gene *lovE*. *Chin. Med. J.* **2009**, *122*, 1800–1805, doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2009.15.016.

- Kennedy, J.; Auclair, K.; Kendrew, S.G.; Park, C.; Vederas, J.C.; Hutchinson, C.R. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science* **1999**, *284*, 1368–1372, doi:10.1126/science.284.5418.1368.
- Bergmann, S.; Schümann, J.; Scherlach, K.; Lange, C.; Brakhage, A.A.; Hertweck, C. Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 213–217, doi:10.1038/nchembio869.
- Chiang, Y.M.; Szewczyk, E.; Davidson, A.D.; Keller, N.; Oakley, B.R.; Wang, C.C.C. A gene cluster containing two fungal polyketide synthases encodes the biosynthetic pathway for a polyketide, asperfuranone, in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2965–2970, doi:10.1021/ja8088185.
- Chiang, Y.M.; Szewczyk, E.; Davidson, A.D.; Entwistle, R.; Keller, N.P.; Wang, C.C.C.; Oakley, B. Characterization of the *Aspergillus nidulans* monodictyphenone gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 2067–2074, doi:10.1128/AEM.02187-09.
- Tsuji, G.; Kenmochi, Y.; Takano, Y.; Sweigard, J.; Farrall, L.; Furusawa, I.; Horino, O.; Kubo, Y. Novel fungal transcriptional activators, Cmr1p of *Colletotrichum lagenarium* and Pig1p of *Magnaporthe grisea*, contain Cys2His2 zinc finger and Zn(II)2Cys6 binuclear cluster DNA-binding motifs and regulate transcription of melanin biosynthesis genes in a developmentally specific manner. *Mol. Microbiol.* **2000**, *38*, 940–954, doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02181.x.
- Valente, S.; Cometto, A.; Piombo, E.; Meloni, G.R.; Ballester, A.R.; González-Candelas, L.; Spadaro, D. Elaborated regulation of griseofulvin biosynthesis in *Penicillium griseofulvum* and its role on conidiation and virulence. *Int. J. Food Microbiol.* **2020**, *328*, 108687, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108687.
- Chen, Y.I.P.; Yuan, G.F.; Hsieh, S.Y.; Lin, Y.U.S.; Wang, W.Y.I.; Liaw, L.I.L.; Tseng, C.P. Identification of the *mokh* gene encoding transcription factor for the upregulation of monacolin K biosynthesis in *Monascus pilosus*. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 287–293, doi:10.1021/jf903139x.
- Lin, H.C.; Chiou, G.; Chooi, Y.H.; McMahon, T.C.; Xu, W.; Garg, N.K.; Tang, Y. Elucidation of the concise biosynthetic pathway of the communesin indole alkaloids. *Angew. Chem.* **2015**, *54*, 3004–3007, doi:10.1002/anie.201411297.
- Tan, D.; Jamieson, C.S.; Ohashi, M.; Tang, M.C.; Houk, K.N.; Tang, Y. Genome-mined Diels-Alderase catalyzes formation of the *cis*-octahydrodecalins of varicidin A and B. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 769–773, doi:10.1021/jacs.8b12010.
- Hidalgo, P.I.; Ullán, R.V.; Albillos, S.M.; Montero, O.; Fernández-Bodega, M.Á.; García-Estrada, C.; Fernández-Aguado, M.; Martín, J.F. Molecular characterization of the PR-toxin gene cluster in *Penicillium roqueforti* and *Penicillium chrysogenum*: cross talk of secondary metabolite pathways. *Fungal Genet. Biol.* **2014**, *62*, 11–24, doi:10.1016/j.fgb.2013.10.009.
- Hidalgo, P.I.; Poirier, E.; Ullán, R.V.; Piqueras, J.; Meslet-Cladière, L.; Coton, E.; Coton, M. *Penicillium roqueforti* PR toxin gene cluster characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 2043–2056, doi:10.1007/s00253-016-7995-5.
- Tang, M.C.; Cui, X.; He, X.; Ding, Z.; Zhu, T.; Tang, Y.; Li, D. Late-stage terpene cyclization by an integral membrane cyclase in the biosynthesis of isoprenoid epoxycyclohexenone natural products. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 5376–5379, doi:10.1021/acs.orglett.7b02653.
- Snini, S.P.; Tannous, J.; Heuillard, P.; Bailly, S.; Lippi, Y.; Zehraoui, E.; Barreau, C.; Oswald, I.P.; Puel, O. Patulin is a cultivar-dependent aggressiveness factor favouring the colonization of apples by *Penicillium expansum*. *Mol. Plant Pathol.* **2016**, *17*, 920–930, doi:10.1111/mpp.12338.
- Guzmán-Chávez, F.; Salo, O.; Nygård, Y.; Lankhorst, P.P.; Bovenberg, R.A.L.; Driessen, A.J.M. Mechanism and regulation of sorbicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *Microb. Biotechnol.* **2017**, *10*, 958–968, doi:10.1111/1751-7915.12736.

- Gao, X.; Chooi, Y.H.; Ames, B.D.; Wang, P.; Walsh, C.T.; Tang, Y. Fungal indole alkaloid biosynthesis: Genetic and biochemical investigation of the tryptochalpanine pathway in *Penicillium aethiopicum*. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2729–2741, doi:10.1021/ja1101085.
- Marcet-Houben, M.; Ballester, A.R.; de la Fuente, B.; Harries, E.; Marcos, J.F.; González-Candelas, L.; Gabaldón, T. Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus. *BMC Genomics* **2012**, *13*, 646, doi:10.1186/1471-2164-13-646.
- Kim, W.; Park, J.J.; Gang, D.R.; Peever, T.L.; Chena, W. A novel type pathway-specific regulator and dynamic genome environments of a solanapyrone biosynthesis gene cluster in the fungus *Ascochyta rabiei*. *Eukaryot. Cell* **2015**, *14*, 1102–1113, doi:10.1128/EC.00084-15.
- Yang, F.; Abdelnabby, H.; Xiao, Y. The Zn(II)2Cys6 putative transcription factor is involved in the regulation of leucinostatin production and pathogenicity of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Can. J. Plant. Pathol.* **2015**, *3*, 342–352, doi:10.1080/07060661.2015.1065437.
- Gardiner, D.M.; Waring, P.; Howlett, B.J. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology* **2005**, *151*, 1021–1032, doi:10.1099/mic.0.27847-0.
- Waring, P.; Eichner, R.D.; Tiwari-Palni, U.; Müllbacher, A. Gliotoxin-E: a new biologically active epipolythiodioxopiperazine isolated from *Penicillium terlikowskii*. *Aust. J. Chem.* **1987**, *40*, 991–997, doi:10.1071/CH9870991.
- Patron, N.J.; Waller, R.F.; Cozijnsen, A.J.; Straney, D.C.; Gardiner, D.M.; Nierman, W.C.; Howlett, B.J. Origin and distribution of epipolythiodioxopiperazine (ETP) gene clusters in filamentous ascomycetes. *BMC Evol. Biol.* **2007**, *7*, 174–188, doi:10.1186/1471-2148-7-174.
- Cramer, R.A.; Gamcsik, M.P.; Brooking, R.M.; Najvar, L.K.; Kirkpatrick, W.R.; Patterson, T.F.; Balibar, C.J.; Graybill, J.R.; Perfect, J.R.; Abraham, S.N.; et al. Disruption of a nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus* eliminates gliotoxin production. *Eukaryot. Cell* **2006**, *5*, 972–980, doi:10.1128/ec.00049-06.
- Schoberle, T.J.; Nguyen-Coleman, C.K.; Herold, J.; Yang, A.; Weirauch, M.; Hughes, T.R.; McMurray, J.S.; May, G.S. A novel C2H2 transcription factor that regulates *gliA* expression interdependently with GliZ in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004336, doi:10.1371/journal.pgen.1004336.
- Abe, Y.; Ono, C.; Hosobuchi, M.; Yoshikawa, H. Functional analysis of *mlcR*, a regulatory gene for ML-236B (compactin) biosynthesis in *Penicillium citrinum*. *Mol. Genet. Genomics* **2002**, *268*, 352–361, doi:10.1007/s00438-002-0755-5.
- Nielsen, J.C.; Grijseels, S.; Prigent, S.; Ji, B.; Dainat, J.; Nielsen, K.F.; Frisvad, J.C.; Workman, M.; Nielsen, J. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 17044, doi:10.1038/nmicrobiol.2017.44.
- Artigot, M.P.; Loiseau, N.; Laffitte, J.; Mas-Reguieg, L.; Tadrist, S.; Oswald, I.P.; Puel, O. Molecular cloning and functional characterization of two CYP619 cytochrome P450s involved in biosynthesis of patulin in *Aspergillus clavatus*. *Microbiology* **2009**, *155*, 1738–1747, doi:10.1099/mic.0.024836-0.
- Kim, Y.T.; Lee, Y.R.; Jin, J.; Han, K.H.; Kim, H.; Kim, J.C.; Lee, T.; Yun, S.H.; Lee, Y.W. Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. *Mol. Microbiol.* **2005**, *58*, 1102–1113, doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04884.x.
- Cepeda-García, C.; Domínguez-Santos, R.; García-Rico, R.O.; García-Estrada, C.; Cajiao, A.; Fierro, F.; Martín, J.F. Direct involvement of the CreA transcription factor in penicillin biosynthesis and expression of the *pcbAB* gene in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Genet. Mol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 7113–7124, doi:10.1007/s00253-014-5760-1.
- Tannous, J.; Kumar, D.; Sela, N.; Sionov, E.; Prusky, D.; Keller, N.P. Fungal attack and host defence pathways unveiled in near-avirulent interactions of *Penicillium expansum creA* mutants on apples. *Mol. Plant. Pathol.* **2018**, *19*, 2635–2650, doi:10.1111/mpp.12734.

- Feng, B.; Friedlin, E.; Marzluf, G.A. A reporter gene analysis of penicillin biosynthesis gene expression in *Penicillium chrysogenum* and its regulation by nitrogen and glucose catabolite repression. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 4432–4439, doi:10.1128/aem.60.12.4432-4439.1994.
- Ellis, C.M. Regulation of polyketide gene expression: the isolation and function of nitrogen regulatory factor NRFA from *Penicillium urticae*. PhD Dissertation, University of Calgary, Calgary, Canada, **1996**, doi:10.11575/PRISM/23302.
- Fedeshko, R.W. Polyketide enzymes and genes. PhD Dissertation, University of Calgary, Calgary, Canada, **1992**, doi:10.11575/PRISM/15229.
- Rollins, M.J.; Gaucher, G.M. Ammonium repression of antibiotic and intracellular proteinase production in *Penicillium urticae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, *41*, 447–455, doi:10.1007/BF00939034.
- Haas, H.; Marzluf, G.A. NRE, the major nitrogen regulatory protein of *Penicillium chrysogenum*, binds specifically to elements in the intergenic promoter regions of nitrate assimilation and penicillin biosynthetic gene clusters. *Curr. Genet.* **1995**, *28*, 177–183, doi:10.1007/BF00315785.
- Martín, J.F. Molecular control of expression of penicillin biosynthesis genes in fungi: regulatory proteins interact with a bidirectional promoter region. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 2355–2362, doi:10.1128/JB.182.9.2355-2362.2000.
- Gente, S.; Poussereau, N.; Fèvre, M. Isolation and expression of a nitrogen regulatory gene, *nmc*, of *Penicillium roqueforti*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, *175*, 291–297, doi:10.1016/S0378-1097(99)00208-6.
- Peñalva, M.A.; Arst, H.N. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 425–451, doi:10.1146/annurev.micro.58.030603.123715.
- Tilburn, J.; Sarkar, S.; Widdick, D.A.; Espeso, E.A.; Orejas, M.; Mungroo, J.; Peñalva, M.A.; Arst, H.N. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **1995**, *14*, 779–790, doi:10.1002/j.1460-2075.1995.tb07056.x.
- Mingot, J.M.; Espeso, E.A.; Díez, E.; Peñalva, M. Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol. Cell Biol.* **2001**, *21*, 1688–1699, doi:10.1128/mcb.21.5.1688-1699.2001.
- Merhej, J.; Richard-Forget, F.; Barreau, C. The pH regulatory factor Pac1 regulates Tri gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet. Biol.* **2011**, *48*, 275–284, doi:10.1016/j.fgb.2010.11.008.
- Wang, Y.; Liu, F.; Wang, L.; Wang, Q.; Selvaraj, J.N.; Zhao, Y.; Wang, Y.; Xing, F.; Liu, Y. The pH-signaling transcription factor AopacC regulates ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 4394–4401, doi:10.1021/acs.jafc.8b00790.
- Suárez, T.; Peñalva, M.A. Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB-pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Mol. Microbiol.* **1996**, *20*, 529–540, doi:10.1046/j.1365-2958.1996.5421065.x.
- Barad, S.; Espeso, E.A.; Sherman, A.; Prusky, D. Ammonia activates pacC and patulin accumulation in an acidic environment during apple colonization by *Penicillium expansum*. *Mol. Plant. Pathol.* **2016**, *17*, 727–740, doi:10.1111/mpp.12327.
- Barad, S.; Horowitz, S.B.; Kobiler, I.; Sherman, A.; Prusky, D. Accumulation of the mycotoxin patulin in the presence of gluconic acid contributes to pathogenicity of *Penicillium expansum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2014**, *27*, 66–77, doi:10.1094/MPMI-05-13-0138-R.
- Chen, Y.; Li, B.; Xu, X.; Zhang, Z.; Tian, S. The pH-responsive PacC transcription factor plays pivotal roles in virulence and patulin biosynthesis in *Penicillium expansum*. *Environ. Microbiol.* **2018**, *20*, 4063–4078, doi:10.1111/1462-2920.14453.

- Zhang, T.; Sun, X.; Xu, Q.; Candelas, L.G.; Li, H. The pH signaling transcription factor PacC is required for full virulence in *Penicillium digitatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 9087–9098, doi:10.1007/s00253-013-5129-x.
- Morgan, B.A.; Banks, G.R.; Toone, M.W.; Raitt, D.; Kuge, S.; Johnston, L.H. The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **1997**, *16*, 1035–1044, doi:10.1093/emboj/16.5.1035.
- Cao, C.; Liu, W.; Li, R. *Penicillium marneffei* SKN7, a novel gene, could complement the hypersensitivity of *S. cerevisiae* skn7 disruptant strain to oxidative stress. *Mycopathologia* **2009**, *168*, 23–30, doi:10.1007/s11046-009-9192-x.
- Montibus, M.; Pinson-Gadais, L.; Richard-Forget, F.; Barreau, C.; Ponts, N. Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Crit. Rev. Microbiol.* **2015**, *41*, 295–308, doi:10.3109/1040841X.2013.829416.
- Zhang, F.; Xu, G.; Geng, L.; Lu, X.; Yang, K.; Yuan, J.; Nie, X.; Zhuang, Z.; Wang, S. The stress response regulator AflSkn7 influences morphological development, stress response, and pathogenicity in the fungus *Aspergillus flavus*. *Toxins* **2016**, *8*, 202, doi:10.3390/toxins8070202.
- Reverberi, M.; Zjalic, S.; Ricelli, A.; Punelli, F.; Camera, E.; Fabbri, C.; Picardo, M.; Fanelli, C.; Fabbri, A.A. Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the *ApyapA* gene. *Eukaryot. Cell* **2008**, *7*, 988–1000, doi:10.1128/EC.00228-07.
- Reverberi, M.; Gazzetti, K.; Punelli, F.; Scarpari, M.; Zjalic, S.; Ricelli, A.; Fabbri, A.A.; Fanelli, C. *Aoyap1* regulates OTA synthesis by controlling cell redox balance in *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *95*, 1293–1304, doi:10.1007/s00253-012-3985-4.
- Dankai, W.; Pongpom, M.; Youngchim, S.; Cooper, C.R.; Vanittanakom, N. The *yapA* encodes bZip transcription factor involved in stress tolerance in pathogenic fungus *Talaromyces marneffei*. *PLoS ONE* **2016**, *11*, 1–16, doi:10.1371/journal.pone.0163778.
- Bayram, Ö.; Braus, G.H. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36*, 1–24, doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00285.x.
- Bayram, Ö.; Krappmann, S.; Ni, M.; Bok, J.W.; Helmstaedt, K.; Valerius, O.; Braus-Stromeier, S.; Kwon, N.J.; Keller, N.P.; Yu, J.H.; Braus, G.H. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* **2008**, *320*, 1504–1506, doi:10.1126/science.1155888.
- Stinnett, S.M.; Espeso, E.A.; Cobeño, L.; Araújo-Bazán, L.; Calvo, A.M. *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin α carrier and on light. *Mol. Microbiol.* **2007**, *63*, 242–255, doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05506.x.
- Kim, H.S.; Han, K.Y.; Kim, K.J.; Han, D.M.; Jahng, K.Y.; Chae, K.S. The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **2002**, *37*, 72–80, doi:10.1016/S1087-1845(02)00029-4.
- Bayram, O.; Krappmann, S.; Seiler, S.; Vogt, N.; Braus, G.H. *Neurospora crassa* *ve-1* affects asexual conidiation. *Fungal Genet. Biol.* **2008**, *45*, 127–138, doi:10.1016/j.fgb.2007.06.001.
- Käfer, E. Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **1965**, *52*, 217–232.
- Kato, N.; Brooks, W.; Calvo, A.M. The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryot. Cell* **2003**, *2*, 1178–1186, doi:10.1128/ec.2.6.1178-1186.2003.
- Duran, R.M.; Cary, J.W.; Calvo, A.M. Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by *veA*, a gene necessary for sclerotial formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *73*, 1158–1168, doi:10.1007/s00253-006-0581-5.
- Calvo, A.M. The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet. Biol.* **2008**, *45*, 1053–1061, doi:10.1016/j.fgb.2008.03.014.

- Cary, J.W.; Calvo, A.M. Regulation of *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis. *Toxin Rev.* **2008**, *27*, 347–370, doi:10.1080/15569540802373999.
- Payne, G.A.; Nystrom, G.J.; Bhatnagar, D.; Cleveland, T.E.; Woloshuk, C.P. Cloning of the *afl-2* gene involved in aflatoxin biosynthesis from *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 156–162, doi:10.1128/aem.59.1.156-162.1993.
- Meyers, D.M.; Obrian, G.; Du, W.L.; Bhatnagar, D.; Payne, G.A. Characterization of *aflJ*, a gene required for conversion of pathway intermediates to aflatoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 3713–3717, doi:10.1128/aem.64.10.3713-3717.1998.
- Du, W.; Obrian, G.R.; Payne, G.A. Function and regulation of *aflJ* in the accumulation of aflatoxin early pathway intermediate in *Aspergillus flavus*. *Food Addit. Contam.* **2007**, *24*, 1043–1050, doi:10.1080/02652030701513826.
- Merhej, J.; Urban, M.; Dufresne, M.; Hammond-Kosack, K.E.; Richard-Forget, F.; Barreau, C. The velvet gene, *FgVe1*, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant. Pathol.* **2012**, *13*, 363–374, doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00755.x.
- Myung, K.; Zitomer, N.C.; Duvall, M.; Glenn, A.E.; Riley, R.T.; Calvo, A.M. The conserved global regulator VeA is necessary for symptom production and mycotoxin synthesis in maize seedlings by *Fusarium verticillioides*. *Plant. Pathol.* **2012**, *61*, 152–160, doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02504.x.
- Hoff, B.; Kamerewerd, J.; Sigl, C.; Mitterbauer, R.; Zadra, I.; Kürnsteiner, H.; Kück, U. Two components of a velvet-like complex control hyphal morphogenesis, conidiophore development, and penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Eukaryot. Cell* **2010**, *9*, 1236–1250, doi:10.1128/EC.00077-10.
- El Hajj Assaf, C.; Snini, S.P.; Tadriss, S.; Bailly, S.; Naylies, C.; Oswald, I.P.; Lorber, S.; Puel, O. Impact of *veA* on the development, aggressiveness, dissemination and secondary metabolism of *Penicillium expansum*. *Mol. Plant. Pathol.* **2018**, *19*, 1971–1983, doi:10.1111/mpp.12673.
- Li, B.; Chen, Y.; Zong, Y.; Shang, Y.; Zhang, Z.; Xu, X.; Wang, X.; Long, M.; Tian, S. Dissection of patulin biosynthesis, spatial control and regulation mechanism in *Penicillium expansum*. *Environ. Microbiol.* **2019**, *21*, 1124–1139, doi:10.1111/1462-2920.14542.
- Baba, S.; Kinoshita, H.; Nihira, T. Identification and characterization of *Penicillium citrinum* VeA and LaeA as global regulators for ML-236B production. *Curr. Genet.* **2012**, *58*, 1–11, doi:10.1007/s00294-011-0359-x.
- Kopke, K.; Hoff, B.; Bloemendal, S.; Katschorowski, A.; Kamerewerd, J.; Kück, U. Members of the *Penicillium chrysogenum* velvet complex play functionally opposing roles in the regulation of penicillin biosynthesis and conidiation. *Eukaryot. Cell* **2013**, *12*, 299–310, doi:10.1128/EC.00272-12.
- Kosalková, K.; García-Estrada, C.; Ullán, R.V.; Godio, R.P.; Feltrer, R.; Teijeira, F.; Mauriz, E.; Martín, J.F. The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie* **2009**, *91*, 214–225, doi:10.1016/j.biochi.2008.09.004.
- Kumar, D.; Barad, S.; Chen, Y.; Luo, X.; Tannous, J.; Dubey, A.; Matana, N.G.; Tian, S.; Li, B.; Keller, N.; et al. LaeA regulation of secondary metabolism modulates virulence in *Penicillium expansum* and is mediated by sucrose. *Mol. Plant. Pathol.* **2017**, *18*, 1150–1163, doi:10.1111/mpp.12469.
- Zhang, X.; Zhu, Y.; Bao, L.; Gao, L.; Yao, G.; Li, Y.; Yang, Z.; Li, Z.; Zhong, Y.; Li, F.-L.; et al. Putative methyltransferase LaeA and transcription factor CreA are necessary for proper asexual development and controlling secondary metabolic gene cluster expression. *Fungal Genet. Biol.* **2016**, *94*, 32–46, doi:10.1016/j.fgb.2016.07.004.
- Zhu, C.; Wang, Y.; Hu, X.; Lei, M.; Wang, M.; Zeng, J.; Li, H.; Liu, Z.; Zhou, T.; Yu, D. Involvement of LaeA in the regulation of conidia production and stress responses in *Penicillium digitatum*. *J. Basic Microbiol.* **2020**, *60*, 82–88, doi:10.1002/jobm.201900367.

Yu, J.; Han, H.; Zhang, X.; Ma, C.; Sun, C.; Che, Q.; Gu, Q.; Zhu, T.; Zhang, G.; Li, D. Discovery of two new sorbicillinoids by overexpression of the global regulator *LaeA* in a marine-derived fungus *Penicillium dipodomyis* YJ-11. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 1–12, doi:10.3390/md17080446.

Kumar, D.; Tannous, J.; Sionov, E.; Keller, N.; Prusky, D. Apple intrinsic factors modulating the global regulator, *LaeA*, the patulin gene cluster and patulin accumulation during fruit colonization by *Penicillium expansum*. *Front. Plant. Sci.* **2018**, *9*, 1–13, doi:10.3389/fpls.2018.01094.

Wang, L.; Zhang, X.; Zhang, K.; Zhang, X.; Zhu, T.; Che, Q.; Zhang, G.; Li, D. Overexpression of global regulator *PbrlaeA* leads to the discovery of new polyketide in fungus *Penicillium brocae* HDN-12-143. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 1–7, doi:10.3389/fchem.2020.00270.

Ahmed, Y.L.; Gerke, J.; Park, H.S.; Bayram, Ö.; Neumann, P.; Ni, M.; Dickmanns, A.; Kim, S.C.; Yu, J.H.; Braus, G.H.; Ficner, R. The velvet family of fungal regulators contains a DNA-binding domain structurally similar to NF- κ B. *PLoS Biol.* **2013**, *11*, e1001750, doi:10.1371/journal.pbio.1001750.

Han, S.; Adams, T.H. Complex control of the developmental regulatory locus *brlA* in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Genet. Genomics* **2001**, *266*, 260–270, doi:10.1007/s004380100552.

Qin, Y.; Bao, L.; Gao, M.; Chen, M.; Lei, Y.; Liu, G.; Qu, Y. *Penicillium decumbens* *BrlA* extensively regulates secondary metabolism and functionally associates with the expression of cellulase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 10453–10467, doi:10.1007/s00253-013-5273-3.

Sigl, C.; Haas, H.; Specht, T.; Pfaller, K.; Kürnsteiner, H.; Zadra, I. Among developmental regulators, *StuA* but not *BrlA* is essential for penicillin V production in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 972–982, doi:10.1128/AEM.01557-10.

Zetina-Serrano, C.; Rocher, O.; Naylies, C.; Lippi, Y.; Oswald, I.P.; Lorber, S.; Puel, O. The *brlA* gene deletion reveals that patulin biosynthesis is not related to conidiation in *Penicillium expansum*. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6660, doi:10.3390/ijms21186660.

Domínguez-Santos, R.; Martín, J.F.; Kosalková, K.; Prieto, C.; Ullán, R.V.; García-Estrada, C. The regulatory factor *PcRFX1* controls the expression of the three genes of β -lactam biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet. Biol.* **2012**, *49*, 866–881, doi:10.1016/j.fgb.2012.08.002.

Domínguez-Santos, R.; García-Estrada, C.; Kosalková, K.; Prieto, C.; Santamarta, I.; Martín, J.F. *PcFKH1*, a novel regulatory factor from the forkhead family, controls the biosynthesis of penicillin in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie* **2015**, *115*, 162–176, doi:10.1016/j.biochi.2015.05.015.

Gil-Durán, C.; Rojas-Aedo, J.F.; Medina, E.; Vaca, I.; García-Rico, R.O.; Villagrán, S.; Levicán, G.; Chávez, R. The *pcz1* gene, which encodes a Zn(II)2Cys6 protein, is involved in the control of growth, conidiation, and conidial germination in the filamentous fungus *Penicillium roqueforti*. *PLoS ONE* **2015**, *10*, 1–17, doi:10.1371/journal.pone.0120740.

Rojas-Aedo, J.F.; Gil-Durán, C.; Goity, A.; Vaca, I.; Levicán, G.; Larrondo, L.F.; Chávez, R. The developmental regulator *Pcz1* affects the production of secondary metabolites in the filamentous fungus *Penicillium roqueforti*. *Microbiol. Res.* **2018**, *212–213*, 67–74, doi:10.1016/j.micres.2018.05.005.

He, Q.-P.; Zhao, S.; Wang, J.-X.; Li, C.-X.; Yan, Y.-S.; Wang, L.; Liao, L.-S.; Feng, J.-X. Transcription factor *NsdD* regulates the expression of genes involved in plant biomass-degrading enzymes, conidiation, and pigment biosynthesis in *Penicillium oxalicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, e01039–18, doi:10.1128/aem.01039-18.

Klis, F.M.; Boorsma, A.; De Groot, P.W.J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2006**, *23*, 185–202, doi:10.1002/yea.1349.

Ruiz-Herrera, J.; Elorza, M.V.; Valentín, E.; Sentandreu, R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* **2006**, *6*, 14–29, doi:10.1111/j.1567-1364.2005.00017.x.

- Munro, C.A.; Selvaggini, S.; De Bruijn, I.; Walker, L.; Lenardon, M.D.; Gerssen, B.; Milne, S.; Brown, A.J.P.; Gow, N.A.R. The PKC, HOG and Ca²⁺ signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **2007**, *63*, 1399–1413, doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05588.x.
- Bölker, M. Sex and crime: heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. *Fungal Genet. Biol.* **1998**, *25*, 143–156, doi:10.1006/fgbi.1998.1102.
- Liu, S.; Dean, R.A. G protein subunit genes control growth, development, and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1997**, *10*, 1075–1086, doi:10.1094/MPMI.1997.10.9.1075.
- Gronover, C.S.; Kasulke, D.; Tudzynski, P.; Tudzynski, B. The role of G protein alpha subunits in the infection process of the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2001**, *14*, 1293–1302, doi:10.1094/MPMI.2001.14.11.1293.
- Chang, M.H.; Chae, K.S.; Han, D.M.; Jahng, K.Y. The GanB G α -protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **2004**, *167*, 1305–1315, doi:10.1534/genetics.103.025379.
- Doehlemann, G.; Berndt, P.; Hahn, M. Different signalling pathways involving a G α protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Mol. Microbiol.* **2006**, *59*, 821–835, doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04991.x.
- Hu, Y.; Liu, G.; Li, Z.; Qin, Y.; Qu, Y.; Song, X. G protein-cAMP signaling pathway mediated by PGA3 plays different roles in regulating the expressions of amylases and cellulases in *Penicillium decumbens*. *Fungal Genet. Biol.* **2013**, *58–59*, 62–70, doi:10.1016/j.fgb.2013.08.002.
- García-Rico, R.O.; Fierro, F.; Martín, J.F. Heterotrimeric G α protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum* controls conidiation mainly by a cAMP-independent mechanism. *Biochem. Cell Biol.* **2008**, *86*, 57–69, doi:10.1139/O07-148.
- Zuber, S.; Hynes, M.J.; Andrianopoulos, A. G-protein signaling mediates asexual development at 25 °C but has no effect on yeast-like growth at 37 °C in the dimorphic fungus *Penicillium marneffeii*. *Eukaryot. Cell* **2002**, *1*, 440–447, doi:10.1128/EC.1.3.440-447.2002.
- Carrasco-Navarro, U.; Vera-Estrella, R.; Barkla, B.J.; Zúñiga-León, E.; Reyes-Vivas, H.; Fernández, F.J.; Fierro, F. Proteomic analysis of the signaling pathway mediated by the heterotrimeric G α protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum*. *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15*, 1–17, doi:10.1186/s12934-016-0564-x.
- Stoll, D.; Schmidt-Heydt, M.; Geisen, R. Differences in the regulation of ochratoxin A by the HOG pathway in *Penicillium* and *Aspergillus* in response to high osmolar environments. *Toxins* **2013**, *5*, 1282–1298, doi:10.3390/toxins5071282.
- Schmidt-Heydt, M.; Stoll, D.; Schütz, P.; Geisen, R.; Oxidative stress induces the biosynthesis of citrinin by *Penicillium verrucosum* at the expense of ochratoxin. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *192*, 1–6, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.008.
- Strauss, J.; Reyes-Dominguez, Y. Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. *Fungal Genet. Biol.* **2011**, *48*, 62–69, doi:10.1016/j.fgb.2010.07.009.
- Bok, J.W.; Keller, N.P. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot. Cell* **2004**, *3*, 527–535, doi:10.1128/EC.3.2.527-535.2004.
- Shwab, E.K.; Bok, J.W.; Tribus, M.; Galehr, J.; Graessle, S.; Keller, N.P. Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryot. Cell* **2007**, *6*, 1656–1664, doi:10.1128/EC.00186-07.
- Ding, Z.; Zhou, H.; Wang, X.; Huang, H.; Wang, H.; Zhang, R.; Wang, Z.; Han, J. Deletion of the histone deacetylase HdaA in endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* Fes1701 induces the complex response of multiple bioactive secondary metabolite production and relevant gene cluster expression. *Molecules* **2020**, *25*, 3657, doi:10.3390/molecules25163657.

Guzman-Chavez, F.; Salo, O.; Samol, M.; Ries, M.; Kuipers, J.; Bovenberg, R.A.L.; Vreeken, R.J.; Driessen, A.J.M. Deregulation of secondary metabolism in a histone deacetylase mutant of *Penicillium chrysogenum*. *Microbiologyopen* **2018**, *7*, 1–15, doi:10.1002/mbo3.598.

Akiyama, D.Y.; Rocha, M.C.; Costa, J.H.; Malavazi, I.; Fill, T.P. The histone deacetylase clr3 regulates secondary metabolite production and growth under oxidative stress conditions in *Penicillium brasilianum*. *BioRxiv* **2020**, 1–27, doi:10.1101/2020.05.01.072108.

He, X.; Zhang, Z.; Chen, Y.; Che, Q.; Zhu, T.; Gu, Q.; Li, D. Varitatin A, a highly modified fatty acid amide from *Penicillium variable* cultured with a DNA methyltransferase inhibitor. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2841–2845, doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00742.

He, X.; Zhang, Z.; Che, Q.; Zhu, T.; Gu, Q.; Li, D. Varilactones and wortmannilactones produced by *Penicillium variable* cultured with histone deacetylase inhibitor. *Arch. Pharm. Res.* **2018**, *41*, 57–63, doi:10.1007/s12272-017-0982-2.

Wang, X.; Filho, J.G.S.; Hoover, A.R.; King, J.B.; Ellis, T.K.; Powell, D.R.; Cichewicz, R.H. Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an atlantic-forest-soil-derived *Penicillium citreonigrum*. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 942–948, doi:10.1021/np100142h.

Liu, D.Z.; Liang, B.W.; Li, X.F.; Liu, Q. Induced production of new diterpenoids in the fungus *Penicillium funiculosum*. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9*, 607–608, doi:10.1177/1934578x1400900502.

Li, G.; Kusari, S.; Golz, C.; Laatsch, H.; Strohmman, C.; Spitteller, M. Epigenetic modulation of endophytic *Eupenicillium* sp. LG41 by a histone deacetylase inhibitor for production of decalin-containing compounds. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 983–988, doi:10.1021/acs.jnatprod.6b00997.

El-Hawary, S.S.; Sayed, A.M.; Mohammed, R.; Hassan, H.M.; Zaki, M.A.; Rateb, M.E.; Mohammed, T.A.; Amin, E.; Abdelmohsen, U.R. Epigenetic modifiers induce bioactive phenolic metabolites in the marine-derived fungus *Penicillium brevicompactum*. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 2–13, doi:10.3390/md16080253.

Guo, D.L.; Qiu, L.; Feng, D.; He, X.; Li, X.H.; Cao, Z.X.; Gu, Y.C.; Mei, L.; Deng, F.; Deng, Y. Three new α -pyrone derivatives induced by chemical epigenetic manipulation of *Penicillium herquei*, an endophytic fungus isolated from *Cordyceps sinensis*. *Nat. Prod. Res.* **2020**, *34*, 958–964, doi:10.1080/14786419.2018.1544974.

Ying, Y.M.; Li, L.; Yu, H.F.; Xu, Y.L.; Huang, L.; Mao, W.; Tong, C.P.; Zhang, Z.D.; Zhan, Z.J.; Zhang, Y. Induced production of a new polyketide in *Penicillium* sp. HS-11 by chemical epigenetic manipulation. *Nat. Prod. Res.* **2020**, doi:10.1080/14786419.2019.1709190.

Asai, T.; Luo, D.; Yamashita, K.; Oshima, Y. Structures and biomimetic synthesis of novel α -pyrone polyketides of an endophytic *Penicillium* sp. in *Catharanthus roseus*. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1020–1023, doi:10.1021/ol303506t.

Xiong, Y.R.; Zhao, S.; Fu, L.H.; Liao, X.Z.; Li, C.X.; Yan, Y.S.; Liao, L.S.; Feng, J.X. Characterization of novel roles of a HMG-box protein PoxHmbB in biomass-degrading enzyme production by *Penicillium oxalicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 3739–3753, doi:10.1007/s00253-018-8867-y.

Karácsony, Z.; Gácsér, A.; Vágvölgyi, C.; Scazzocchio, C.; Hamari, Z. A dually located multi-HMG-box protein of *Aspergillus nidulans* has a crucial role in conidial and ascospore germination. *Mol. Microbiol.* **2014**, *94*, 383–402, doi:10.1111/mmi.12772.

Tannous, J.; Barda, O.; Luciano-Rosario, D.; Prusky, D.B.; Sionov, E.; Keller, N.P. New insight into pathogenicity and secondary metabolism of the plant pathogen *Penicillium expansum* through deletion of the epigenetic reader SntB. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1–13, doi:10.3389/fmicb.2020.00610.

Berg, M.A.V.D.; Albang, R.; Albermann, K.; Badger, J.H.; Daran, J.-M.; Driessen, A.J.M.; Garcia-Estrada, C.; Fedorova, N.D.; Harris, D.M.; Heijne, W.H.M.; et al. Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1161–1168, doi:10.1038/nbt.1498.

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

2. Le complexe velvet

Le complexe velvet est un complexe protéique formé de quatre protéines régulatrices : VeA (velvet A), VelB (velvet-like B), VosA (viability of spores A) et VelC (velvet like C). Ce complexe est fortement conservé chez les ascomycètes et les basidiomycètes (Ni and Yu, 2007). Le membre fondateur de ce groupe est la protéine VeA qui a été identifiée pour la première fois chez *Aspergillus nidulans* il y a quatre décennies et demi. Chez *A. nidulans*, le gène *veA* code pour une protéine de 573 acides aminés, caractérisée par un domaine conservé au niveau de son extrémité N-terminale (Ozgür Bayram et al., 2008a) et une séquence de localisation nucléaire (NLS) (Figure 16) (Stinnett et al., 2007). Au niveau de son extrémité C-terminale, un domaine PEST (riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T)) est présent (Figure 16) (Kim et al., 2002). Ce domaine PEST est également retrouvé chez les protéines orthologues de VeA chez *A. parasiticus*, *A. fumigatus* et *Neurospora crassa* (O. Bayram et al., 2008).

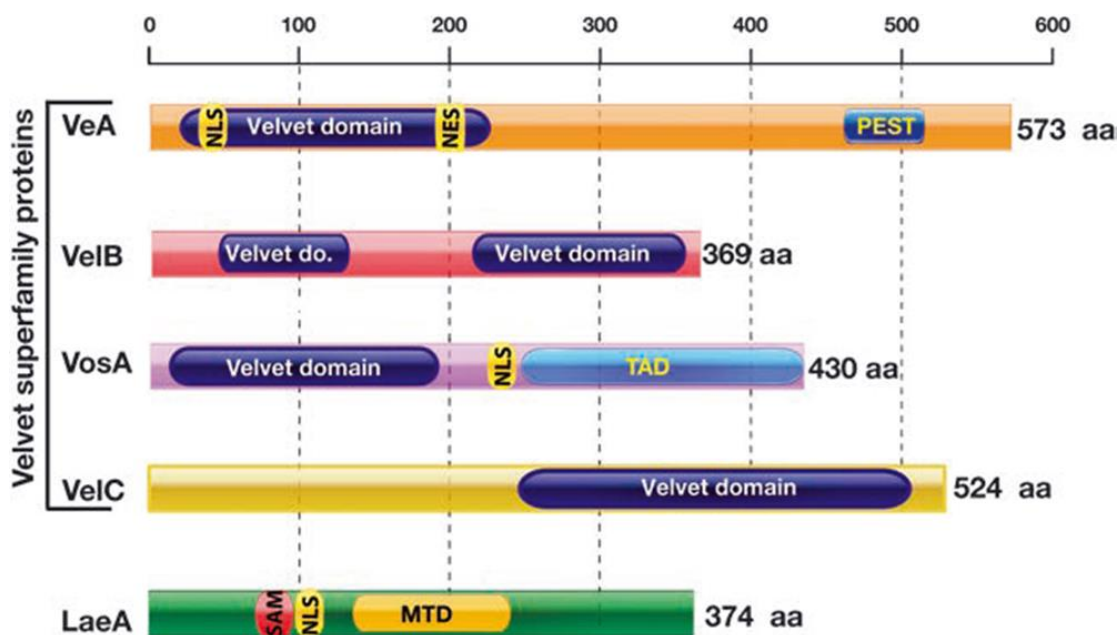


Figure 16. Architecture des domaines des protéines de la famille Velvet et de LaeA chez *Aspergillus nidulans*. SAM, site de liaison de la S-adenosyl méthionine ; TAD, domaine d'activation de la transcription ; PEST, séquence riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T) ; MTD, domaine de la méthyltransférase ; NLS, signal de localisation nucléaire (d'après Bayram et Braus, 2012).

La localisation intracellulaire de VeA dépend de la lumière : à l'obscurité, VeA est localisé dans le noyau, alors qu'à la lumière, cette protéine reste dans le cytoplasme (Stinnett et al., 2007). En 1965, Käfer était le premier à caractériser le gène *veA* en créant le premier mutant *veA1* chez *A. nidulans*. Chez ce mutant, une mutation au niveau du codon d'initiation de la transcription a engendré une protéine tronquée où les 36 premiers acides aminés sont absents, ce qui entraîne la perte de la séquence NLS. La perte de cette dernière explique la localisation cytoplasmique de VeA, indépendamment de la lumière chez ce mutant. Dans cette même étude, il a été démontré que le transport de VeA vers le noyau dépend fortement de l'importine α KapA et que l'interaction entre ces deux protéines nécessite la présence d'un domaine NLS fonctionnel.

De nombreuses études ont montré que *veA* joue le rôle de régulateur positif de la reproduction sexuée et de régulateur négatif de la reproduction asexuée (Kim et al., 2002 ; Mooney and Yager, 1990 ; Yager, 1992).

Outre son implication dans la reproduction des champignons filamenteux, ce facteur de transcription joue un rôle primordial dans la régulation du métabolisme secondaire (Calvo, 2008 ; Cary and Calvo, 2008 ; El Hajj Assaf et al., 2018 ; Kato et al., 2003). De nombreuses études ont été effectuées sur le champignon modèle *A. nidulans* et ont montré que VeA intervient dans la régulation de gènes impliqués dans la synthèse de la stérigmatocystine et faisant partie du cluster de la biosynthèse de ce métabolite. En effet, la synthèse de AflR, le facteur de transcription spécifique de la voie de biosynthèse de cette mycotoxine, dépend directement de VeA (Chang et al., 1993; Flaherty and Payne, 1997; Kato et al., 2003). La régulation du métabolisme secondaire par VeA a également été étudiée chez d'autres espèces de champignons filamenteux : ce FT global est nécessaire pour l'expression des FT spécifiques AflJ chez *A. flavus* et AflR chez *A. parasiticus* (Du et al., 2007 ; Meyers et al., 1998). VeA intervient également dans la régulation de la synthèse de l'acide cyclopiazonique et l'aflatrème chez *A.*

flavus (Duran et al., 2007), la pénicilline chez *A. nidulans* (Kato et al., 2003) et chez *Penicillium rubens* anciennement *P. chrysogenum*) (Hoff et al., 2010) et les trichothécènes chez *Fusarium graminearum* (Merhej et al., 2011). El Hajj Assaf et al. (2018) ont montré que l'absence de *veA* altère fortement la production de patuline et de citrinine sur milieux de culture synthétiques chez *P. expansum*. Cette diminution de production est associée à une inhibition drastique dans l'expression des gènes de biosynthèse de ces deux mycotoxines. Les études *in vitro* effectuées dans cette étude ont été complétées par des études *in vivo*, qui ont montré que le mutant $Pe\Delta veA$ est incapable de produire de la patuline dans les pommes. Dans cette même étude, l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire global de *P. expansum* a été comparée chez la souche sauvage et la souche mutante. Les résultats ont montré que 15 des 35 gènes impliqués dans la synthèse du squelette de la structure des métabolites secondaires (« backbone genes ») étudiés, incluant des PKS, des NRPS, des terpène synthases et des DMATS étaient différemment exprimée chez la souche dépourvue de *veA*. Ces résultats confirment alors l'hypothèse de l'implication de VeA dans la modulation du métabolisme secondaire chez *P. expansum*.

Etant donné que le complexe velvet est formé de plusieurs protéines, Bayram et al. (2008) se sont intéressés à identifier les interactions existantes entre ces dernières, en partant d'une souche d'*A. nidulans* exprimant une protéine VeA couplé à une étiquette TAP (TAP : Tandem Affinity Purification)-tag à l'extrémité C-terminale, et en utilisant la technique de purification par affinité. Les résultats ont encore confirmé que les interactions entre les membres de cette famille dépendent de la lumière : à l'obscurité, les protéines VelB, LaeA et l'importine α KapA, permettant la translocation de VeA dans le noyau, interagissent avec VeA, alors qu'en présence de la lumière, seul VelB interagit avec VeA.

Dans cette même étude, pour renforcer davantage les résultats obtenus, la technique du double hybride chez la levure a été employée et a confirmé les interactions VeA-VelB et VeA-

LaeA. L'ensemble des résultats ainsi obtenu a permis de conférer à VeA le rôle de pont entre les protéines VelB et LaeA.

Pour encore plus de précision, des analyses par fluorescence ont permis de localiser les interactions entre ces différentes protéines et ont validé que l'interaction VeA-LaeA intervient dans le noyau, alors que VeA et VelB interagissent dans le noyau et le cytoplasme. Sachant que LaeA est toujours localisé dans le noyau, son interaction avec VeA ne peut être que nucléaire. Ceci suggère que VelB doit être capable de passer du cytoplasme au noyau, même en absence de séquence NLS dans sa séquence. A partir de ces résultats, Bayram et al. (2018) ont pu démontrer que VeA assiste VelB pour rentrer dans le noyau et former ensuite le complexe Velvet.

VelB est donc un membre clé de la famille velvet qui a été étudié chez différentes espèces fongiques (Chang et al., 2013 ; Jiang et al., 2012 ; Webster and Sil, 2008). En interagissant avec d'autres protéines de la famille, ce facteur régit plusieurs processus physiologiques tels que le développement, la reproduction sexuée et asexuée, la virulence et le métabolisme secondaire. Chez *A. nidulans*, VelB affecte positivement la formation de spores, sa surexpression conduisant à une augmentation de la production de spores tandis que sa délétion inhibe l'expression de trois gènes régulateurs de la reproduction asexuée (*brlA*, *abaA* et *vosA*), entraînant ainsi une réduction de la formation de spores (Park et al., 2012c).

VelB interagit également avec VosA pour former un hétérocomplexe qui régule positivement le développement asexué et la germination chez *A. nidulans* (Park et al., 2012 ; Sarikaya-Bayram et al., 2015). Cet hétérocomplexe régule plusieurs gènes qui sont impliqués dans le développement fongique, la différenciation, la maturation des spores et le métabolisme secondaire (Zhao et al., 2021 ; Son et Park, 2021 ; Wu et al., 2021). VelB interagit non seulement avec VosA, mais aussi avec VeA et LaeA et plusieurs études menées sur ce trimère

ont permis (Bayram et al., 2008 ; Sarikaya-Bayram et al., 2015) de proposer un mécanisme d'interaction de ces protéines chez *A. nidulans* (Figure 17). Brièvement, à l'obscurité, VeIB

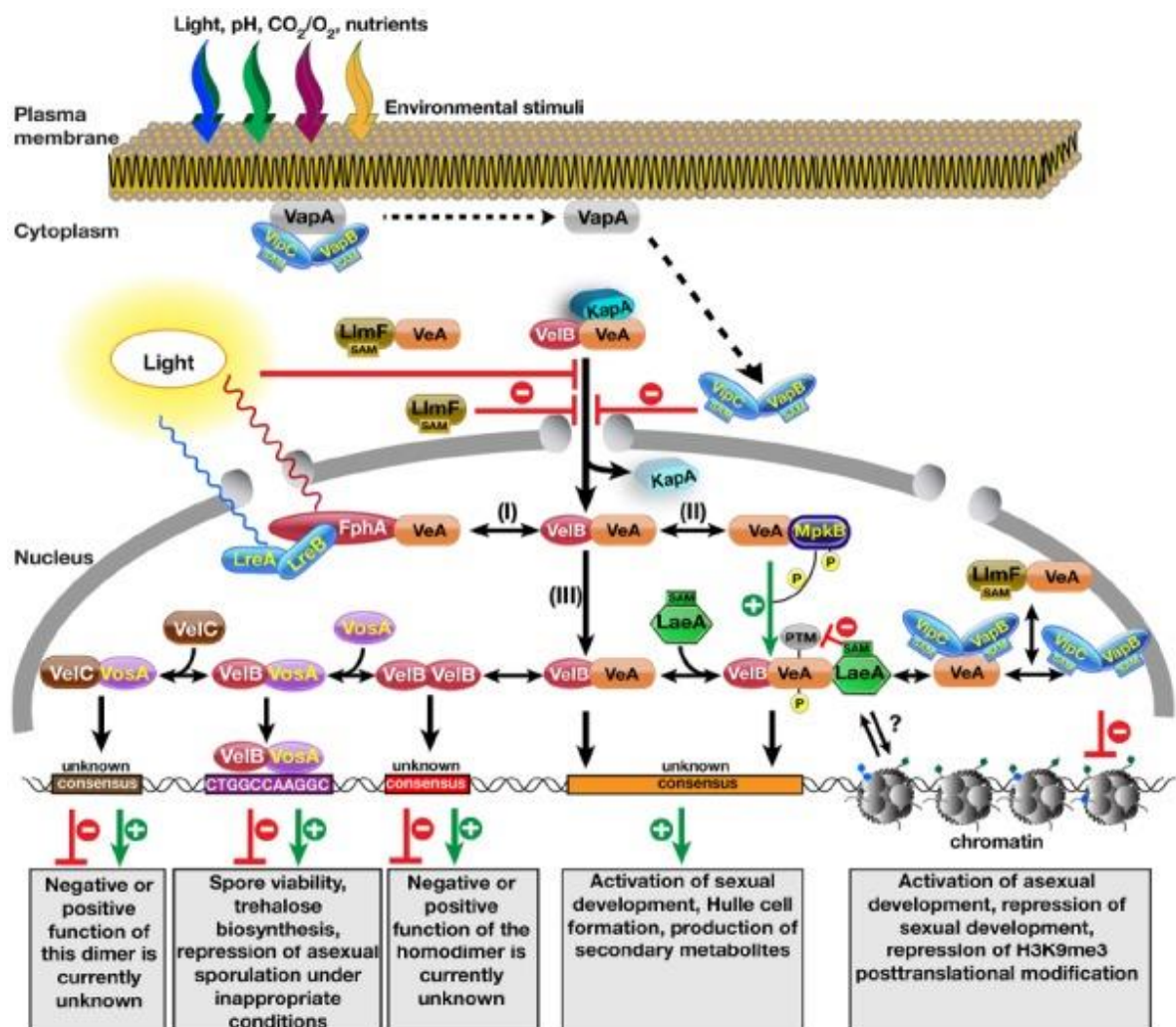


Figure 17. Les complexes moléculaires formés par les protéines de la famille velvet et les méthyltransférases sur le contrôle du développement fongique et de la production de métabolites secondaires (d'après Sarikaya-Bayram et al. 2015).

interagit avec VeA dans le cytoplasme pour former un hétérodimère, qui est ensuite transféré dans le noyau, où une interaction se produit entre VeA et LaeA. Le rôle de pont de VeA permet la formation d'un complexe VeIB/VeA/LaeA dans le noyau qui agit comme un régulateur positif du développement sexuel et de la synthèse des métabolites secondaires. A la lumière, VeA reste dans le cytoplasme, ce qui empêche la formation du complexe, stoppant ainsi l'activité épigénétique de LaeA.

Chez *A. ochraceus*, les protéines du complexe VelB, VeA et LaeA sont impliquées dans la régulation de la production d'ochratoxine A, du métabolisme secondaire, du développement asexué, de la virulence et de la gravité de la maladie dans le fruit (Wang et al., 2019). Chez les espèces d'*A. flavus*, les interactions entre les sous-unités VelB, VeA et LaeA du complexe velvet sont conservées et requises lors de la conidiation et de la synthèse des aflatoxines. En outre, l'absence de VelB inhibe la conidiation et la production d'aflatoxines (Chang et al., 2013). De plus, il a été démontré que l'interaction VelB/VosA est conservée chez ces espèces ; les régulateurs du complexe velvet jouent un rôle dans le métabolisme secondaire, la biosynthèse du tréhalose et la tolérance au stress (Eom et al., 2018). Le complexe velvet est également présent dans le genre *Fusarium*. Chez *F. graminearum* (Jiang et al., 2012), *F. verticillioides* (Lan et al., 2014) et *F. oxysporum* (López-Berges et al., 2013), les sous-unités de ce complexe interagissent pour réguler la biosynthèse du déoxynivalénol, de la fumonisine et de la beauvéricine, respectivement, ainsi que le développement, la pathogénicité et la virulence. Les protéines de la famille velvet VelB, VeA et VosA sont également impliquées dans la régulation de la conidiation, du développement, de la virulence et de la pathogénicité de plusieurs espèces fongiques appartenant aux genres *Arthrobotrys*, *Botrytis*, *Culvularia* et *Zymoseptoria* (Yang et al., 2013 ; Gao et al., 2017 ; Tiley et al., 2019 ; Zhang et al., 2019).

Le rôle de VelB chez les espèces de *Penicillium* est peu documenté. Chez *P. rubens*, trois sous-unités de la famille velvet, *P. rubens* VelB (PrVelB), PrVelC et PrVosA jouent également un rôle dans la régulation de la biosynthèse de la pénicilline et de la conidiation dépendante de la lumière, avec PrVelA et PrLaeA (Kopke et al., 2013). Li et al. (2019) ont prouvé l'implication de trois protéines VelB, VeA et VelC dans la régulation de la biosynthèse de la patuline chez *P. expansum*.

Il a également été montré que différents composants du complexe velvet peuvent jouer des rôles opposés dans la régulation du métabolisme secondaire. Chez *P. rubens*, PrVelC avec

PrVeA et la méthyltransférase PrLaeA, ont induit la production de pénicilline, en revanche, PrVelB agit comme un répresseur (Hoff et al., 2010 ; Kopke et al., 2013).

LaeA contrôle certains clusters de gènes du métabolisme secondaire chez *P. rubens* (Kosalková et al., 2009). Sa surexpression a entraîné une multiplication par quatre de l'expression de *pcbC* et *penDE*, conduisant à une augmentation de 25% de l'expression des gènes de la biosynthèse de la pénicilline, tandis que sa suppression a réduit de manière significative l'expression de ces gènes. En revanche, l'absence de différence de niveau d'expression ($\Delta laeA$ vs. sauvage) pour le gène *rpt* impliqué dans la deuxième étape de la voie de biosynthèse de la roquefortine C suggère que PcLaeA ne régule pas la biosynthèse de la roquefortine C. La régulation du métabolisme secondaire de *P. expansum* par LaeA a été étudiée à partir de deux souches sur des milieux différents (Kumar et al., 2016). Sur les 54 gènes codant pour les « backbone genes », beaucoup sont régulés positivement par *laeA*, comme ceux impliqués dans la biosynthèse de la roquefortine C, un métabolite inconnu de type ETP et la patuline. Chez *P. oxalicum*, il a été montré que LaeA contrôle aussi, entre autres, l'expression de certains clusters de gènes du métabolisme secondaire (X. Zhang et al., 2016). Toutefois, la suppression du gène *laeA* chez *P. oxalicum* n'a pas eu d'incidence sur le cluster de gènes supposé être impliqué dans la biosynthèse de la roquefortine C/méléagrine/oxaline. La différence observée entre ces études concernant la régulation par *laeA* des gènes impliqués dans la biosynthèse de la roquefortine C pourrait être due aux espèces utilisées et aux milieux testés.

Zhu et al. (2020) ont démontré le rôle de *laeA* dans la régulation du métabolisme secondaire, la production de conidies et les réponses au stress chez *P. digitatum*. La délétion de *PdlaeA* a entraîné une diminution de l'expression de divers clusters de gènes de métabolites secondaires, y compris le cluster Tq impliqué dans la biosynthèse des tryptoquialanines. La délétion de ce gène a également affecté l'expression de plusieurs régulateurs de la conidiation, dont BrlA. Une comparaison entre les souches sauvage et le mutant $\Delta laeA$ a révélé une

sensibilité accrue de la souche mutante en conditions alcalines. La perte de *PdlaeA* n'a pas eu d'effet significatif sur la virulence de la souche mutante. Ces travaux ont montré l'implication de *laeA* dans la biosynthèse de plusieurs métabolites secondaires ainsi que dans le développement et l'adaptation de *P. digitatum* à son environnement.

Yu et al. (2019) ont montré que la surexpression de *LaeA* dans la souche marine YJ-11 de *P. dipodomyis* entraîne des changements non seulement morphologiques mais aussi métaboliques. Les mutants de surexpression ont montré la capacité de produire plusieurs sorbicillinoïdes, dont deux nouveaux composés, ainsi que quatre analogues connus de la sorbicilline. Ces résultats indiquent que *LaeA* joue un rôle clé dans l'activation de gènes cryptiques qui sont silencieux sous l'expression normale de *LaeA*.

Kumar et al. (2018) ont montré les effets des facteurs intrinsèques des pommes dans la modulation de l'accumulation de patuline et sur l'expression des gènes *laeA* et *patA-patO* dans les pommes colonisées par *P. expansum*. Les auteurs ont utilisé deux variétés de pommes, Golden Delicious et Granny Smith, qui ont des profils de valeur solide soluble totale similaires au moment de la maturation mais des valeurs de pH et des concentrations d'acide malique différentes. Ces facteurs ont affecté de manière différentielle l'expression de *laeA* ainsi que l'expression des gènes de biosynthèse de la patuline et, par conséquent, l'accumulation de patuline. Pour comprendre la complexité de ces interactions, des études *in vitro* ont été réalisées. Ces études ont prouvé que les concentrations de saccharose et d'acide malique et le pH sont tous impliqués, en association avec l'acide chlorogénique et l'épicatéchine, dans un système d'interaction complexe qui module la régulation et la production de patuline.

P. brocae HDN-12-143 est un champignon isolé de sédiments marins qui a un fort potentiel pour la biosynthèse de métabolites secondaires. Wang et al. (2020) ont étudié l'effet de la surexpression du gène *laeA* sur le métabolisme secondaire de *P. brocae*. Cette surexpression a révélé que quatre composés pouvaient être isolés, dont la chlorhydrine de fumigatine et un

nouveau composé polycétide, l'iso-fumigatine chlorhydrate. En résumé, les résultats indiquent que LaeA peut supprimer ou activer l'expression de clusters de gènes et que sa surexpression peut induire la production de nouveaux métabolites secondaires.

TRAVAIL EXPERIMENTAL



Chapitre 1

Implication de VelB dans le développement, la pathogénicité et le métabolisme secondaire chez *Penicillium expansum*

RESUME DE L'ETUDE

Penicillium expansum est un phytopathogène nuisible, cause principale de la maladie de la moisissure bleue, provoquant ainsi la pourriture des pommes après récolte. Ce champignon ubiquitaire produit une grande variété de mycotoxines, parmi lesquelles la patuline, la citrinine et la chaétoglobosine A, auxquelles nous nous sommes particulièrement intéressées dans cette étude. Chez les champignons filamenteux, les gènes codant pour les protéines impliquées dans la biosynthèse des mycotoxines sont organisés en clusters. Ces gènes sont, le plus souvent, régulés par des facteurs de transcription (FT) spécifiques localisés à l'intérieur du cluster (Keller et Hohn, 1997). L'activation des FT spécifiques et par conséquent la production de métabolites secondaires chez les champignons filamenteux est contrôlée par des FT globaux, codés par des gènes situés à l'extérieur des clusters et régulés par de nombreux facteurs environnementaux parmi lesquels la lumière, le pH, les sources de carbone et d'azote. Parmi ces facteurs de transcription, VelB est un membre du complexe velvet, une famille de protéines régulatrices dont l'activité dépend de la lumière (Bayram et al., 2008). L'implication de VelB dans la régulation de divers processus physiologiques tels que le développement, la reproduction sexuée et asexuée, le métabolisme secondaire et la virulence, a été démontrée chez de nombreuses espèces fongiques (Chang et al., 2013 ; Kopke et al., 2013 ; Park et al., 2012 ; Yang et al., 2013).

Cependant, le rôle de VelB dans la régulation de ces différents processus chez *P. expansum* n'a pas été jusque-là investigué.

Ce premier chapitre du travail expérimental porte ainsi sur la détermination des rôles spécifiques du FT global VelB par des études *in vitro* et *in vivo*. Pour cela, une souche mutante *Pe Δ velB* ainsi qu'une souche complémentée *Pe Δ velB:velB* ont été générées à partir de la souche sauvage WT de *P. expansum*. En premier lieu, une étude morphologique a été effectuée pour montrer comment VelB peut affecter la croissance et le développement du champignon sur

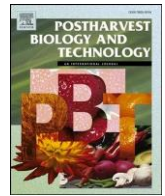
milieu synthétique. En deuxième lieu, une étude de la pathogénicité a été mise en place sur des pommes de la variété Golden Delicious pour déterminer l'implication de VelB sur la virulence du champignon. En troisième lieu, l'effet de VelB sur la conidiation a été analysé. En quatrième lieu, une analyse du métabolome secondaire en utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a été effectuée en vue de déterminer le rôle de VelB dans la régulation de la production de métabolites secondaires par *P. expansum*. En dernier lieu, une étude transcriptomique par microarray a été réalisée pour découvrir l'implication de VelB dans l'expression des gènes intervenant dans le métabolisme secondaire.

Pour conclure, nos observations soutiennent l'hypothèse que le FT global VelB joue un rôle primordial dans la régulation du développement, de la pathogénicité, de la virulence, de la conidiation et du métabolisme secondaire de *P. expansum*.

La partie expérimentale, les résultats et la discussion de cette étude sont détaillés dans ce chapitre conformément au format de publication de Postharvest Biology and Technology.

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Postharvest Biology and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/postharvbio

Implication of VelB in the development, pathogenicity, and secondary metabolism of *Penicillium expansum*

Nadia Tahtah^a, Chrystian Zetina-Serrano^a, Ophélie Rocher^a, Claire Naylies^a, Yannick Lippi^a, André El Khoury^b, Ali Atoui^c, Emilien L. Jamin^a, Isabelle P. Oswald^a, Sophie Lorber^a, Olivier Puel^{a,*}

^a Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

^b Centre d'Analyses et de Recherche (CAR), Unité de Recherche Technologies et Valorisation Agro-Alimentaire (UR-TVA), Faculty of Sciences, Saint-Joseph University of Beirut, Campus of Sciences and Technologies, P.O. Box 17-5208, Beirut, Lebanon

^c Laboratory of Microbiology, Department of Life and Earth Sciences, Faculty of Sciences, Lebanese University, Hadath Campus, P.O. Box 5, Beirut, Lebanon

ARTICLE INFO

Keywords:

*Penicillium expansum*Velvet complex VelB Apple Transcriptome Metabolome

ABSTRACT

Penicillium expansum is the main cause of blue mold disease and the main producer of patulin in apple-derived products. This fungus also produces a wide variety of secondary metabolites, including citrinin and chaetoglobosin A. Secondary metabolism is regulated by global transcription factors that are affected by environmental signals. The light-dependent global transcription factor VelB, a member of the velvet complex, plays an important role in the regulation of secondary metabolism and fungal development in many fungal species. However, the specific roles of VelB in *P. expansum* remain unknown. A Pe Δ velB mutant and a complemented Pe Δ velB:velB strain were generated to investigate the role of VelB in pathogenicity and secondary metabolism. The Pe Δ velB mutant colonized apples, but at a lower rate than the wild type and complemented strains. Conidiation was significantly reduced in the Pe Δ velB strain. Under light conditions, the Pe Δ velB strain showed a reduced level of spore viability. Deletion of the velB gene strongly inhibited the production of patulin, citrinin, and chaetoglobosin A on synthetic media or in planta, but increased the production of fumarylalanine; these changes were associated with down-regulation or upregulation of the genes involved in their respective biosynthesis. Analysis of the global secondary metabolism of the Pe Δ velB strain revealed that 22 backbone genes were modulated. In addition, genes involved in siderophore biosynthesis, ergosterol biosynthesis, and nitrate assimilation were also upregulated in the Pe Δ velB strain. Taken together, our results demonstrate that VelB is involved in the development, pathogenicity, and secondary metabolism of *P. expansum*.

1. Introduction

Penicillium is a fungal genus known to produce beneficial compounds that are used in the medical, biotechnology, and food industries (Bernáldez et al., 2013; Dupont et al., 2017). *Penicillium* species mainly display saprophytic behavior. However, a small group of pathogenic species emerged 15 million years ago (Steenwyk et al., 2019) including *Penicillium expansum*, *P. digitatum*, and *P. italicum*, that can colonize fruit such as apples and citrus. *P. expansum* is a necrotrophic and psychrophilic fungus of soil origin. During harvest, post-harvest and storage, this fungus can invade fruit tissues through wounds (e.g. punctures, stem pulls, or bruises) (Luciano-Rosario et al., 2020) and cause maceration and spoilage. It is the main cause of blue mold disease in pome fruit (Pitt

and Hocking, 2009). Like many fungal species, *P. expansum* produces secondary metabolites (SMs) called mycotoxins that are harmful to animals and humans. Mycotoxins are considered a threat to food safety (Cano et al., 2016; Payros et al., 2021) and are also responsible for enormous economic and financial losses worldwide every year. Among mycotoxins, patulin has many detrimental effects on human health (Puel et al., 2010). For this reason, the maximum tolerated levels of patulin are regulated in European countries (EC Commission Regulation, 2006). In general, the ecological roles of mycotoxins remain poorly documented. Although not required for disease establishment or development, patulin may be an aggressiveness factor depending on the apple variety tested (Snini et al., 2016). Also produced by *P. expansum*, citrinin has been shown to act as a secondary virulence factor although its involvement in

* Corresponding author at: UMR1331 Toxalim – INRAE / INPT / UPS, 180 Chemin de Tournefeuille, BP 93173, 31027 Toulouse cedex 3, France. E-mail address: olivier.puel@inrae.fr (O. Puel).

<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112121>

Received 11 July 2022; Received in revised form 19 September 2022; Accepted 20 September 2022

Available online 28 September 2022

0925-5214/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

pathogenicity is still the subject of debate (Ballester et al., 2015; Touhami et al., 2018). A wide variety of other SMs are synthesized by *P. expansum* during its life cycle including andrastins (Kim et al., 2012), chaetoglobosins, roquefortines C and D, communesins (Andersen et al., 2004), expansolides (Massias et al., 1991). Added to this list, many other SMs that have not yet been identified and characterized have been highlighted by non-targeted liquid chromatography combined with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) (Zetina-Serrano et al., 2020). In filamentous fungi, genes encoding proteins involved in SM biosynthesis are organized into clusters located in the same chromo-somal region (Keller et al., 2005). Within the same cluster, specific transcription factors (TFs) that act directly on these genes, play a role in the regulation of SM synthesis (El Hajj Assaf et al., 2020). In *P. expansum*, several SM biosynthetic gene clusters (BGCs) have been attributed to SMs produced by this species (Tannous et al., 2018a). The patulin biosynthetic cluster is composed of 15 genes (PEXP_094320--PEXP_094460) (Tannous et al., 2014; Ballester et al., 2015) of which PEXP_094430 encodes a specific TF, PatL, that triggers the expression of genes involved in patulin biosynthesis (Li et al., 2015; Ballester et al., 2015; Snini et al., 2016).

In response to environmental cues, the expression of internal TFs is also regulated by more global TFs located outside the BGCs (El Hajj Assaf et al., 2020; Tannous et al., 2018b; Barad et al., 2016; Zhang et al., 2016). One environmental signal that significantly affects the development and secondary metabolism of filamentous fungi is light. Bayram et al. (2008) showed that a protein complex, the VelB/VeA/LaeA velvet complex coordinates the light cue with secondary metabolism and fungal development in *Aspergillus nidulans*. VelB is a key member of the velvet family and has already been investigated in some filamentous fungal species (Bayram and Braus, 2012; Chang et al., 2013; Jiang et al., 2012; Webster and Sil, 2008). VelB interacts with other proteins of the family thereby controlling several physiological processes including development, sexual and asexual reproduction, virulence, and secondary metabolism.

VelB interacts with VosA, another member of the velvet family to form a heterocomplex that positively regulates asexual development and germination in *A. nidulans* (Park et al., 2012; Sarikaya-Bayram et al., 2015). This heterocomplex regulates several genes involved in fungal development, differentiation, spore maturation, and secondary metabolism (Zhao et al., 2021; Son and Park, 2021; Wu et al., 2021). VelB interacts not only with VosA, but also with VeA and LaeA and several studies conducted on this trimer enabled (Bayram et al., 2008; Sarikaya-Bayram et al., 2015) to propose a mechanism for the interaction of these proteins in *A. nidulans*. Briefly, in the dark, VelB interacts with VeA in the cytoplasm to form a heterodimer, which is then transferred to the nucleus, where an interaction occurs between VeA and LaeA. The bridging-role of VeA enables the formation of a VelB/VeA/LaeA complex in the nucleus that acts as a positive regulator of sexual development and SM synthesis. In the light, VeA remains in the cytoplasm, which prevents the formation of the complex, and consequently the LaeA activity through histone methylation (Strauss and Reyes-Dominguez, 2011).

In *A. ochraceus*, the velvet complex proteins VelB, VeA, and LaeA are implicated in the regulation of secondary metabolism including ochratoxin A production, asexual development, virulence and disease severity in pears (Wang et al., 2019). In *A. flavus* species, interactions between the VelB, VeA, and LaeA subunits of the velvet complex are conserved and required for conidiation and aflatoxin synthesis. In addition, the absence of VelB inhibits conidiation and the production of aflatoxins (Chang et al., 2013). What is more, the VelB/VosA interaction has been shown to be conserved in these species; velvet regulators play a role in secondary metabolism, trehalose biosynthesis, and stress tolerance (Eomet et al., 2018). The velvet complex is also found in the genus *Fusarium*. In *F. graminearum* (Jiang et al., 2012), *F. verticillioides* (Lan et al., 2014), and *F. oxysporum* (López-Berges et al., 2013), the subunits of this complex interact to regulate deoxynivalenol, fumonisins, and beauvericin

biosynthesis, respectively, as well as to regulate development, pathogenicity, and virulence. The velvet complex proteins VelB, VeA, and VosA are also involved in the regulation of conidiation, and in the development, virulence, and pathogenicity of several fungal species belonging to the genera *Arthrotrichum*, *Botrytis*, *Culvularia*, and *Zygo-septoria* (Yang et al., 2013; Gao et al., 2017; Tiley et al., 2019; Zhanget al., 2019).

The role of VelB in *Penicillium* species has been little documented so far. In *P. chrysogenum*, three subunits of the velvet family, *P. chrysogenum* VelB (PcVelB), PcVelC, and PcVosA play a role in the regulation of penicillin biosynthesis and light-dependent conidiation, along with PcVelA and PcLaeA (Kopke et al., 2013). Li et al. (2019) proved the involvement of three velvet proteins, VelB, VeA, and VelC, in the regulation of patulin biosynthesis in *P. expansum*. Nevertheless, how VelB affects the pathogenicity and virulence of *P. expansum* on apples and its secondary metabolism is still poorly understood. To identify the specific roles of VelB in *P. expansum*, we generated a *PeΔvelB* null mutant strain and a complemented *PeΔvelB:velB* strain, and compared the pathogenicity and virulence of the wild type (WT), *PeΔvelB*, and *PeΔvelB:velB* strains in vivo on the 'Golden Delicious' cultivar. We assessed the effects of deletion of the *velB* gene on growth, and on in vitro macro and microscopic morphology. We also investigated the effect of VelB on conidiation. We analyzed the metabolome of the *PeΔvelB* strain in vitro on synthetic media, in the dark and in the light, using an untargeted metabolomics approach with LC-HRMS, and also performed transcriptome analysis of the WT and *PeΔvelB* strains by microarray.

2. Material and methods

2.1. Strains, media and culture conditions

The wild type (WT) *Penicillium expansum* strain NRRL 35695 was used in this study. It was isolated from grape berries found in Occitania region (France). All strains in this study were grown on malt extract agar (MEA) (Biokar Diagnostics, Allonne, France; 30 g L⁻¹ malt extract, 15 g L⁻¹ agar) in the dark for 7 days at 25 °C, unless otherwise indicated.

To prepare the protoplasts, cultures were grown for 12 h on an orbital shaker at 150 rpm at 25 °C in 0.250 L of yeast extract peptone dextrose (YPD) medium (per liter of medium: 20 g dextrose, 10 g yeast extract, 20 g bacto-peptone), inoculated with 3 × 10⁷ conidia.

2.2. Construction and validation of the *PeΔvelB* and *PeΔvelB:velB* strains

The *PeΔvelB* mutant strain was constructed using the homologous recombination strategy. The construction of the deletion mutant strain is described in detail in Supporting Information. Briefly, the hygromycin resistance marker (*hph*), flanked by the DNA sequences that correspond to the 5' upstream and 3' downstream sequences of the *velB* coding region, was used to replace the *velB* gene (PEXP_065290). The gene deletion cassette was created by fusion PCR using genomic DNA from *P. expansum* strain NRRL 35695 to amplify the 5' upstream and 3' downstream flanking regions according to Zetina-Serrano et al. (2020). Following a previously described method (Snini et al., 2016), the WT strain was transformed using the deletion cassette.

For complementation, and to transform protoplasts of the *PeΔvelB* strain, the primers dvelBF3/dvelBR3 were used to generate the DNA fragment from the WT strain containing the whole coding *velB* gene sequence. The sequences of all primers are listed in Table S1.

2.3. Validation of the deletion *PeΔvelB* strain

Once the deletion cassette was inserted and the WT strain transformed, the transformants were screened using three different methodological approaches: (i) PCR screening of *velB*, hygromycin gene, and 5' and 3' locus/deletion cassette junctions (Fig. S1), (ii) genome walking to confirm that the selection marker was correctly inserted at the *velB*

locus and that only one copy of the deletion cassette was integrated in the genome of transformants (Fig. S2), (iii) RT-qPCR to check the absence of *velB* gene expression (Fig. S3). The different experiments are described in detail in the Supporting Information.

2.4. *In vitro* growth, and macroscopic and microscopic morphology of the *PeΔvelB* strain

The WT, null mutant, and complemented strains were grown on MEA for 7 days at 25 °C in the dark. After the incubation period, a sporesuspension of each strain was prepared at a concentration of 10^9 conidia L^{-1} . The spore suspensions were centrally inoculated onto MEA (10^{-5} L), and potato dextrose agar (PDA) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; 30 g L^{-1} potato extract, 15 g L^{-1} agar) media and incubated at 25 °C for 10 days in the dark. An CX41 optical microscope (Olympus, Rungis, France) was used to analyze microscopic characteristics after 7 days of incubation. A SZX9 stereomicroscope (Olympus) was then used to study macroscopic characteristics after 10 days of incubation. All the studies were performed in triplicates.

2.5. Pathogenicity study and production of patulin

Blue mold development and production of patulin on apples of the WT, null mutant, and complemented strains were assessed in an *in vivo* study performed on 'Golden Delicious' apples. The apples were purchased from a supermarket (Carrefour, France) in Toulouse and their surface was sterilized with a 2 % sodium hypochlorite solution. The experiment was performed as previously described (El Hajj Assaf et al., 2018). Briefly, for each strain, apples were wounded using a sterile toothpick and contaminated with a 10^{-5} L of a spore suspension containing 10^7 conidia L^{-1} . The apples were then incubated for 14 days in the dark at 25 °C. The diameters of the rotten spots were measured everyday. At the end of the incubation period, these measurements were used to calculate the growth rate and rot volume according to Baert et al. (2007). Thereafter, the apples were blended to form a puree (MacDonald et al., 2000) in which patulin production was determined by high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD) as described by Zetina-Serrano et al. (2020). Results are expressed on a fresh weight basis. Nine biological replicates were performed for each strain.

2.6. HPLC-DAD analysis of patulin, citrinin, and chaetoglobosin A

Patulin, citrinin, and chaetoglobosin A were quantified using the Ultimate 3000 HPLC system (Dionex/ThermoScientific). For patulin analysis, the parameters described by Zetina-Serrano et al. (2020) were used. Citrinin and chaetoglobosin A were quantified using a 0.15 m x 2 10^{-3} m, Luna@ 5 10^{-6} m, C18 column (Phenomenex, Le Pecq, France) at 30 °C at a flow rate of $3.33 \cdot 10^{-6}$ $L s^{-1}$. Water acidified with 0.05 % formic acid was used as eluent A, while acetonitrile acidified with 0.05 % formic acid was used as eluent B. The column was equilibrated with a mixture of 60 % solvent A and 40 % solvent B. The mixture of solvents A and B was maintained throughout the whole run. The concentration of citrinin and chaetoglobosin A was measured by a fluorescent detector at an excitation wavelength of $3.3 \cdot 10^{-7}$ m and an emission wavelength of $4.85 \cdot 10^{-7}$ m. Results are expressed on a fresh weight basis.

2.7. *In planta* analysis of secondary metabolites

The secondary metabolites were detected on 'Golden Delicious' apples. At 30 days post-inoculation (DPI) and incubation at 25 °C, SMs were extracted from the apple flesh, and spores were also harvested according to Zetina-Serrano et al. (2020).

The extracts were analyzed by LC-HRMS. All the parameters were identical to those previously detailed (Zetina-Serrano et al., 2020).

2.8. Microarray gene expression analysis

Total RNA was extracted and gene expression profiles were performed according to Zetina-Serrano et al. (2020). Four biological replicates of each strain were used for expression analysis. Microarray data and experimental details have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through Gene Expression Omnibus (GEO) Series accession number GSE209861 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE209861>).

2.9. Quantification of conidiation

To investigate the effect of the *velB* gene deletion on conidiation, a quantification assay was performed based on the method described by Kopke et al. (2013) with some modifications. Briefly, the WT, *PeΔvelB*, and *PeΔvelB:velB* strains were grown on MEA Petri dishes at 25 °C for 7 days. Thereafter, a spore suspension of each strain was made and quantified using a Malassez cell to obtain a concentration of 10^{10} spores L^{-1} . PDA medium was inoculated with 2 10^{-5} L of the spore suspensions and incubated for 7 days at 27 °C. For quantitative assays, a 0.01 m diameter disc was cut out of each plate, at exactly the same distance from the edge of the Petri dish and transferred to a Falcon tube containing 0.010 L of the suspension buffer (0.85 % NaCl and 0.1 % Tween 80). Each sample was treated with a sonicator (Bransonic 221 Ultrasonic bath, Roucaire, Les Ulis, France) for 300 s to separate the spores. Appropriate dilutions were made and the solutions were filtered through Miracloth (Calbiochem®, Merck KGaA) to determine the concentration of spores with a Malassez counting cell chamber. All spore measurements were performed in triplicate, using three independent isolates.

2.10. Spore viability assay

Spore viability assays were performed based on the method described by Kopke et al. (2013) with a few modifications. Briefly, strains were grown on MEA for 4, 7, 10, and 13 days to obtain spore suspensions with a concentration of 10^{10} spores L^{-1} . A disc (diameter 0.01 m) was cut out, at exactly the same distance from the center of each plate. Like for the quantification assays, the samples were treated with a sonicator; dilutions were made and filtered through Miracloth. Approximately 100 conidia were inoculated on MEA medium for 4 days at 25 °C, then, germinating spores were counted using a Malassez counting chamber. All measurements were performed in triplicate, using three independent isolates.

2.11. Statistical analysis

A Student's test and a one-way analysis of variance (ANOVA) were used to analyze the differences between the WT, null mutant, and complemented strains. Differences were considered to be statistically significant for a *p*-value < 0.05. GraphPad Prism 4 Software (San Diego, CA, USA) was used to perform all statistical analysis of the data in this study.

3. Results

3.1. *VelB* deletion impacts *in vitro* growth, macroscopic, and microscopic morphology

The *PeΔvelB* strain had different morphological features from those found in the wild type (WT) and *PeΔvelB:velB* strains.

Macroscopically, the conidial areas of all three strains had the normal blue-green color of *P. expansum*. However, the colony of the *PeΔvelB* strain was surrounded by a yellow ring instead of the marked white margin observed around the colonies of the other strains (Fig. 18).

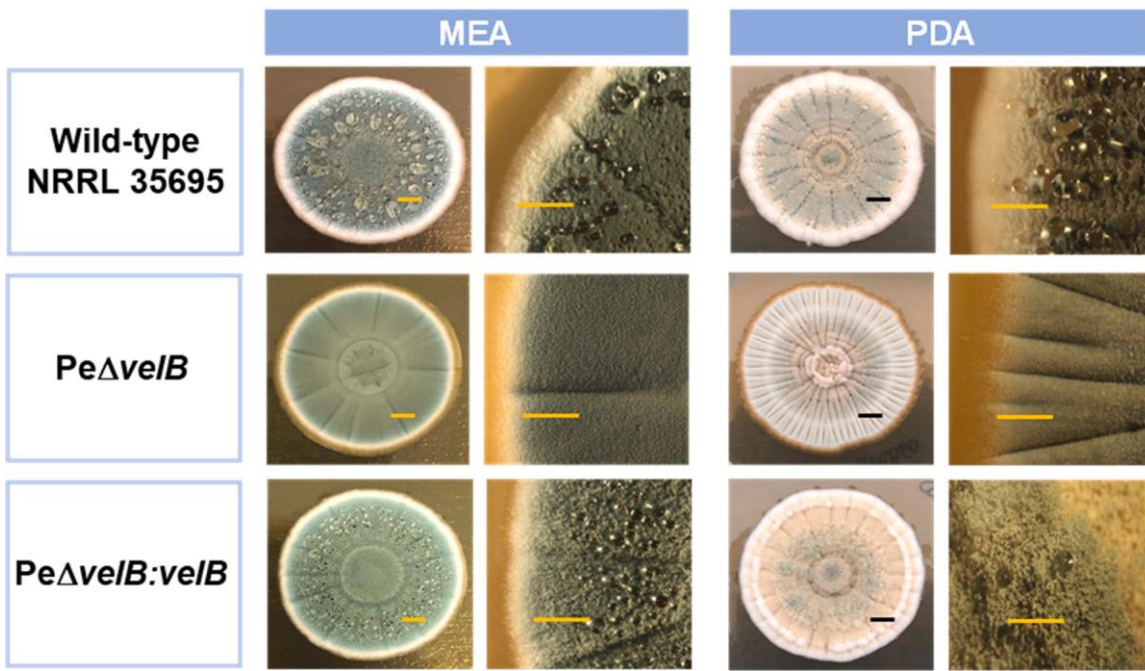


Fig. 18. Morphological appearance of *Penicillium expansum* wild type, *PeΔvelB*, and *PeΔvelB:velB* strains. Macroscopic appearance and stereomicroscopic observations (x12) of colonies. Cultures were grown on malt extract agar (MEA) and potato dextrose agar (PDA). Orange and black scale bars represent 0.01 m.

In addition, on MEA and PDA media, the *PeΔvelB* strain displayed much more pronounced radial furrows than the other strains (Fig. 18). The texture of the WT and complemented strains was similar: both had a granular surface due to the aggregation of conidiophores, whereas the

surface of the *PeΔvelB* strain was flat with less fasciculation, and had a velvety texture in which conidiophores emerged from submerged hyphae (Fig. 18). On both media tested, the WT and complemented strains produced coremia as well as exudates on the surface of colonies,

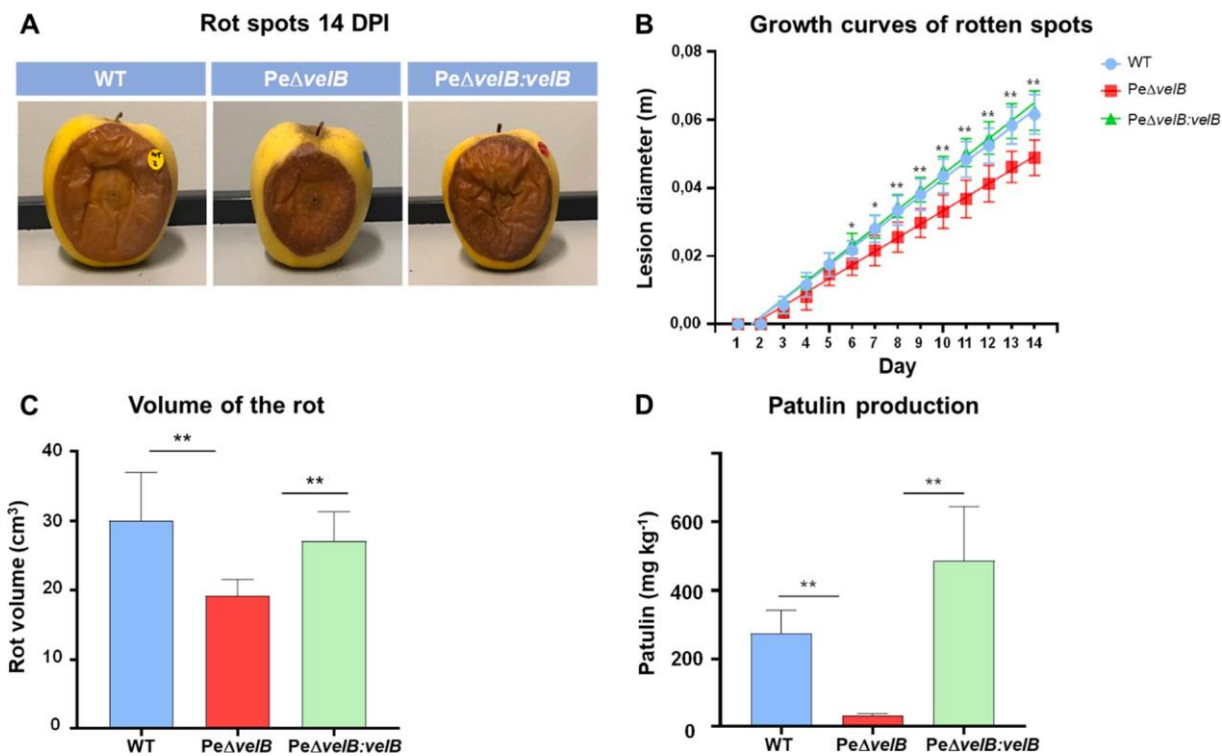


Fig. 19. ‘Golden Delicious’ apples infected with the WT, *PeΔvelB*, and *PeΔvelB:velB* strains. A) Rot spots after 14 days post-inoculation (DPI). B) Growth curves of the rotten spots. Rotten spot diameters were measured daily for 14 days. C) Rot volumes calculated as described by Baert et al. (2007) at the end of the incubation period. D) Patulin production in apples. Patulin production was measured by high-performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD) at 277 nm. Apples were incubated in the dark at 25 °C. Graphs show the mean ± standard error of the mean (SEM) of nine replicates. * *p*-value < 0.05; *p*-value < 0.01.

whereas the *PeΔvelB* strain formed no such structures and produced no exudates (Fig. 18).

Microscopically, except for the absence of spore chains in the *PeΔvelB* strain, there was no significant morphological difference between the three strains.

3.2. *VelB* is involved in the pathogenicity of *P. expansum*

To determine the effect of *velB* deletion on the development, dissemination, and pathogenicity of *P. expansum*, fresh 'Golden Delicious' apples were inoculated with the WT, *PeΔvelB*, and *PeΔvelB:velB* strains and incubated for 14 days. The WT and *PeΔvelB:velB* strains showed similar developmental patterns throughout the incubation period (Fig. 19 A). During the first 5 days post-inoculation (DPI), no significant differences in the developmental pattern were detected between the WT and *PeΔvelB* strains. From 6 DPI, the *PeΔvelB* strain displayed a delayed developmental profile compared to that of the WT and *PeΔvelB:velB* strains (Fig. S4). At the end of the 14-day incubation period, the diameters of the lesions caused by the WT, *PeΔvelB*, and *PeΔvelB:velB* strains were $6 \times 10^{-2} \pm 2 \times 10^{-3}$ m, $4.9 \times 10^{-2} \pm 2 \times 10^{-3}$ m, and $6.3 \times 10^{-2} \pm 2 \times 10^{-3}$ m, respectively, showing that the lesion caused by the null mutant was 20 % smaller than that caused by the WT and complemented strains (Fig. 19B). Based on the method previously described by Baert et al. (2007), the rot volume was calculated at the end of the incubation period. Apples infected with the *PeΔvelB* strain displayed 30 % less decay than apples infected with the WT and complemented strains (Fig. 19 C).

At 14 DPI, the concentrations of patulin were measured in the apples. Patulin concentrations were 635 ± 284 mg kg⁻¹, 49 ± 12 mg kg⁻¹, and 564 ± 70 mg kg⁻¹, respectively, in apples infected with the WT, *PeΔvelB*, and *PeΔvelB:velB* strains, showing that the null mutant produced 90 % less patulin in planta than the WT and complemented strains (Fig. 19 D).

'Golden Delicious' apples were inoculated with a spore solution of either the WT or *PeΔvelB* strain and incubated in light or in dark conditions for 30 days.

In the dark, some aspects of apples infected with each strain were comparable: both strains were able to invade the apple mesocarp and cause tissue decay. After piercing the fruit wall, they were able to emerge from the fruit and complete their cycle: conidiophores clustered in coremia were produced on all apples, unlike the *ΔveA* strain (El Hajj Assaf et al., 2018). In the light, the WT and null mutant strains seemed unable to complete the asexual reproductive cycle; the cell wall of fruit was not pierced and the strains were unable to produce the coremia and synnemata observed on apples incubated in the dark.

3.3. *VelB* deletion has a light-independent impact on conidiation

To determine the impact of *velB* deletion on conidiation in *P. expansum*, quantitative analysis of conidiation (Fig. 20) as well as spore viability assays were performed on the WT, *PeΔvelB*, and *PeΔvelB:velB* strains (Fig. 21).

A quantitative assay was performed and germinating spores of the WT, null mutant, and complemented strains were quantified after 7 DPI at 25 °C on PDA medium, in light and dark conditions (Fig. 20A and B). In both conditions, the number of conidia quantified in the *PeΔvelB* strain (7.6×10^5 in light and 7.3×10^5 in dark) was lower than the number quantified in the WT (14.4×10^5 in the light and 13.3×10^5 in the dark) and *PeΔvelB:velB* strains (12.2×10^5 in the light and 11.2×10^5 in the dark) (Fig. 20A and B). Spore viability assays were conducted on the WT, *PeΔvelB*, and *PeΔvelB:velB* strains, in light and dark conditions, to examine the effect of the *velB* gene deletion on viable *P. expansum* spores (Fig. 21).

Under light conditions, no significant difference in percent spore viability was found among the three strains until 10 DPI, after which the

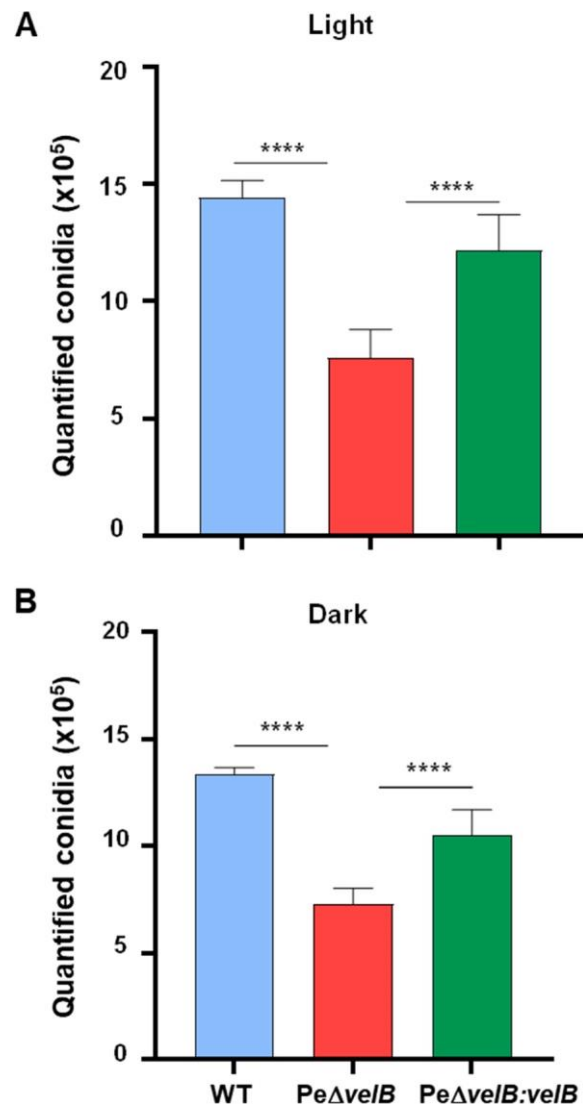


Fig. 20. Quantification of conidiation A) in the light and B) in the dark. *Penicillium expansum* WT, *PeΔvelB*, and *PeΔvelB:velB* strains were grown on potato dextrose agar medium for 7 days at 25 °C (10^{-5} L of a spore solution at 10^8 spores L⁻¹). All measurements were performed in triplicate using three independent isolates. Graphs show the mean \pm standard error of the mean (SEM) of nine replicates. **** *p*-value < 0.0001.

percent spore viability in the *PeΔvelB* strain declined and was lower than that in the WT and *PeΔvelB:velB* strains (Fig. 21 A). At 10 DPI, the spore viability of the *PeΔvelB* strain was 40 % and 30 % lower than that of the WT and the *PeΔvelB:velB* strain respectively (Fig. 21 A). At 13 DPI, the percentage of spore viability of the *PeΔvelB* strain was 25 % lower than that of the WT and 20 % lower than that of the *PeΔvelB:velB* strain (Fig. 21 A). Under dark conditions, no significant difference in spore viability was detected in the three strains over the entire inoculation period (Fig. 21B).

3.4. Transcriptomic analysis in the *velB* deletion mutant

To assess the impact of *velB* deletion on SM gene expression, microarray analysis was performed on WT and *PeΔvelB* strains after 5 days of growth on MEA. Only when the log₂-fold change (log₂FC) was < 1 or > 1 and the *p*-value was < 0.05 were the genes considered to be significantly differentially expressed. A gene ontology (GO) analysis was performed with FungiFun (Priebe et al., 2015) on significantly up- and down-expressed genes. Compared to the WT strain, the *PeΔvelB* strain

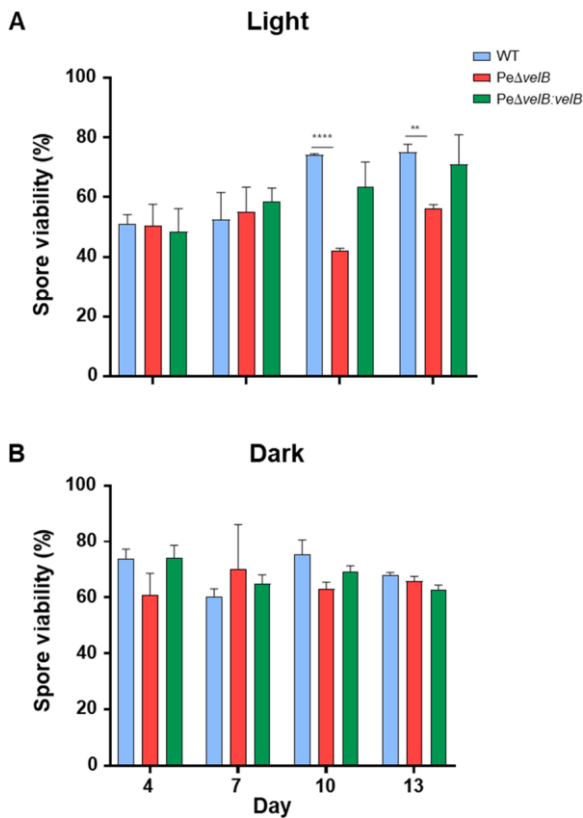


Fig. 21. Spore viability assays performed A) in the light and B) in the dark. Spore suspensions with a concentration of 10^{10} conidia L^{-1} were prepared for each strain 4, 7, 10, and 13 days post-inoculation. One hundred conidia were then inoculated on malt extract agar medium for 4 days at 27 °C, after which germinating spores were counted. All measurements were performed in triplicate using three independent isolates. Graphs show the mean \pm standard error of the mean (SEM) of nine replicates. ** p -value < 0.01; **** p -value < 0.0001.

showed 1180 differentially expressed genes (DEGs), of which 533 were up-expressed and 647 down-expressed. Of the 533 genes upregulated in the *PeΔvelB* mutant, 156 genes were significantly enriched in GO categories. Deletion of the *velB* gene led to upregulation of genes involved in (i) biosynthesis and transport of siderophores, (ii) nitrate assimilation, and (iii) ergosterol biosynthesis. Of the 647 down-regulated genes, 275 were significantly enriched in GO categories. Deletion of *velB* led to down-regulation of genes belonging to GO categories involved in the catabolic processes of degradation of the plant complex carbohydrates such as starch or cellulose.

First, the genes involved in the patulin, citrinin, and chaetoglobosin A clusters were evaluated (Fig. 22).

The results showed that 14 of the 15 genes involved in patulin production (Fig. 22 A) and 9 of the 10 genes of the cluster involved in citrinin production (Fig. 22 B) were significantly down-regulated. All genes involved in chaetoglobosin A production were significantly down-regulated (Fig. 22 C). In the patulin cluster, the most down-regulated genes were *patO*, *patA*, *patG*, *patB*, *patJ*, and *patC* (Fig. 22 A). In the citrinin BGC, the most down-regulated genes were *citB* (PEXP_005540), *citS* (PEXP_005520), *citD* (PEXP_005560), *citE* (PEXP_005580), *orf5* (PEXP_005510,) and PEXP_005600 gene (Fig. 22 B). *patL* (PEXP_094430) and *cmA* (PEXP_005550) genes that encode specific patulin and citrinin cluster-specific TFs, respectively, were the only genes that underwent no significant decrease in their expression in the *PeΔvelB* strain, with a fold change of 0.178 and 0.112, respectively (Fig. 22 A and B). In the chaetoglobosin A BGC, the most down-regulated genes were

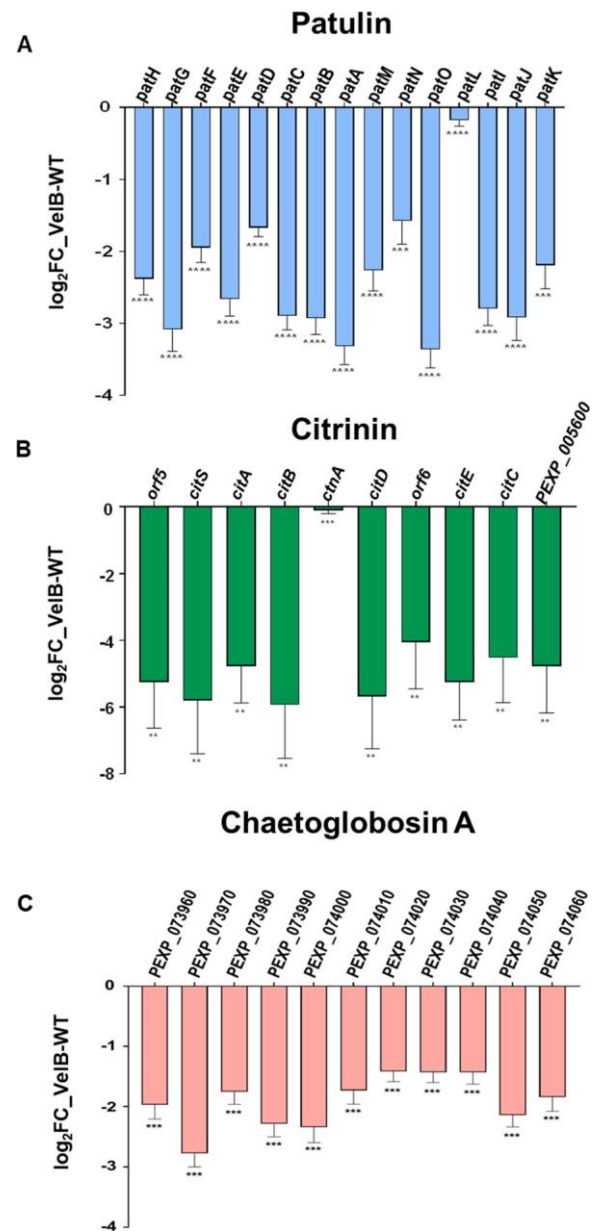


Fig. 22. Log₂ fold change (log₂FC) in the expression of genes belonging to the clusters involved in patulin, citrinin, and chaetoglobosin A biosynthesis in the WT and *PeΔvelB* strains. A) Patulin cluster (PEXP_094320-PEXP_094460). B) Citrinin cluster (PEXP_005510-PEXP_005600). C) Chaetoglobosin cluster (PEXP_073960-PEXP_074060). Strains were grown for 5 days at 25 °C in the dark on malt extract agar. Graphs show the mean standard error of the mean (SEM) of four replicates. Asterisks indicate significant differences between the WT and *PeΔvelB* strains. * p -value < 0.01; ** p -value < 0.001; *** p -value < 0.0001.

PEXP_073970, PEXP_074000, PEXP_073990, and PEXP_074050 (Fig. 22 C). The expression of these three BCGs was compared in the WT and *PeΔvelB* strains by RT-qPCR using the primers listed in Table S2. The results showed a decrease in the expression of most of the genes in the *PeΔvelB* strain (Fig. S5, S6, and S7), thereby confirming the microarray results.

The expression of backbone genes, including polyketide synthases (PKSs), non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs), and dimethylallyl tryptophan synthases (DMATs) was assessed in the WT and *PeΔvelB* strains. Nineteen backbone genes tested were differently expressed in the *PeΔvelB* strain (Fig. 23). Specifically, 13 backbone genes,

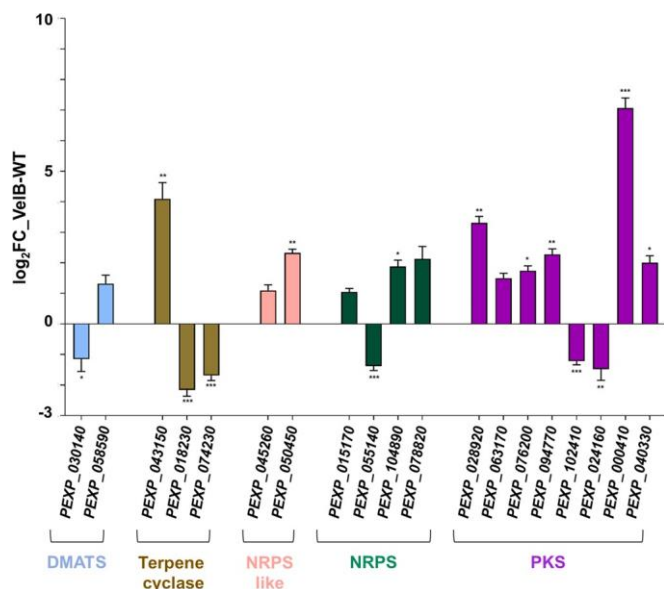


Fig. 23 Relative expression of 19 genes encoding other backbone enzymes (dimethylallyl tryptophan synthases (DMATs), terpene cyclases, non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs), NRPS like, polyketide synthases (PKSs) identified in the d1 strain genome. Graphs show the mean standard error of the mean (SEM) from four replicates. Asterisks show significant differences between the wild type (WT) and Pe Δ velB strains. **p*-value < 0.05; ***p*-value < 0.01; ****p*-value < 0.001.

PEXP_000410 ($\log_2FC=7.05$), PEXP_015170 (NRPS fungisporin cluster, $\log_2FC=1.05$), PEXP_028920 ($\log_2FC=3.31$), PEXP_043150 ($\log_2FC=4.10$), PEXP_040330 ($\log_2FC=2.00$), PEXP_045260 ($\log_2FC=1.09$), PEXP_050450 ($\log_2FC=2.33$), PEXP_058590 ($\log_2FC=1.32$), PEXP_063170 ($\log_2FC=1.49$), PEXP_076200 ($\log_2FC=1.74$), PEXP_078820 ($\log_2FC=2.13$), PEXP_094770 ($\log_2FC=2.28$), and PEXP_104890 ($\log_2FC=1.88$) were upregulated in the Pe Δ velB strain.

Among the genes upregulated, the protein encoded by PEXP_078820 has strong homology (63 % identity) with SidE, which is responsible for fumarylalanine biosynthesis in *A. fumigatus* (Steinchen et al., 2013). Conversely, in addition to *patK*, *citS*, and PEXP_074060 (PKS/NRPS chaetoglobosin cluster), six backbone genes, PEXP_018230 ($\log_2FC=-2.16$), PEXP_024160 ($\log_2FC=-1.48$), PEXP_030140 (DMATS roquefortine C cluster, $\log_2FC=-1.15$), PEXP_055140 ($\log_2FC=-1.38$), PEXP_102410 ($\log_2FC=-1.22$), and PEXP_074230 (bicyclogermacrene synthase, $\log_2FC=-1.69$) were down-regulated in the Pe Δ velB strain.

PEXP_049080, which encodes FlbD, a conidiophore development protein, was over-expressed in the Pe Δ velB strain compared to in the WT strain ($\log_2FC=1.41$) (Table 7). Another gene encoding the ConF conidiation protein (PEXP_070520) was also overexpressed in the Pe Δ velB strain ($\log_2FC=1.74$) (Table 7).

Deletion of *velB* caused upregulation of the *veA* gene ($\log_2FC=2.02$) that encodes another velvet complex protein, whereas the other members of the velvet family were not affected by the loss of *velB* (Table 7).

3.5. *VelB* positively regulates patulin, citrinin, and chaetoglobosin A production

The production of patulin, citrinin, and chaetoglobosin A by the WT, null mutant, and complemented strains was assessed on two different culture media (Fig. 24).

After 7 days of incubation, large amounts of patulin were produced by the WT ($10\,557 \pm 1\,997$ mg kg⁻¹ on MEA and $13\,067 \pm 1\,907$ mg kg⁻¹ on PDA)

and the complemented ($10\,800 \pm 3\,237$ mg kg⁻¹ on MEA and $13\,267 \pm 2\,202$ mg kg⁻¹ on PDA) strains (Fig. 24 A and B). Significantly reduced patulin production was observed in the Pe Δ velB strain on MEA ($300\,64$ mg kg⁻¹) (Fig. 24 A) while no patulin was detected on PDA (Fig. 24 B).

The amounts of citrinin detected on MEA and PDA were smaller than the amounts of patulin measured in the WT (19.4 ± 2.7 mg kg⁻¹ on MEA and 29.4 ± 4.1 mg kg⁻¹ on PDA) and complemented (34.7 ± 7.8 mg kg⁻¹ on MEA and 32.1 ± 9.2 mg kg⁻¹ on PDA) strains (Fig. 24 C and D). The Pe Δ velB strain was unable to produce citrinin on either medium (Fig. 24 C and D).

Significant amounts of chaetoglobosin A were produced by the WT (88 ± 11 mg kg⁻¹ on MEA and 104 ± 30 mg kg⁻¹ on PDA) and Pe Δ velB: *velB* (56.4 mg kg⁻¹ on MEA and 100.13 mg kg⁻¹ on PDA) strains (Fig. 24 E and F). Negligible amounts of chaetoglobosin A were produced by the Pe Δ velB strain on MEA (7.2 ± 4.9 mg kg⁻¹) (Fig. 24 E) and on PDA (2.2 ± 1.1 mg kg⁻¹) (Fig. 24 F).

3.6. *VelB* regulates secondary metabolites in fruit

We analyzed *P. expansum* compounds secreted in the apple flesh at 30 DPI. Since *VelB* is known to be involved in the maturation of conidia, SMs extracted from conidia harvested when the fungus exited through the apple epicarp were also analyzed. Compared to the WT strain, a lack of citrinin production in apple was observed in the Pe Δ velB strain, confirming the in vitro results (Fig. S8). A decrease in the level of chaetoglobosin derivatives was also observed in the mutant strain with a change in the pattern of chaetoglobosin derivatives (Fig. S9A and B). In agreement with a previous observation made in a Pe Δ brlA mutant (Zetina-Serrano et al., 2020), no trace of chaetoglobosin A was detected in apple flesh but only in conidia, with the chaetoglobosin A signal being drastically reduced in Pe Δ velB conidia.

Finally, a striking observation was the near disappearance of a group of unknown compounds sharing similarities in their MS/MS spectra (Table S3 and Fig. S10A-I) and having the chemical formulas C₁₉H₁₆N₂O₂ (RT=29.91 and RT=30.52), C₂₀H₁₈N₂O₂ (RT=33.77), C₁₈H₁₈N₂O₂ (RT=12.77), C₁₈H₁₆N₂O₂ (RT=11.66 and RT=15.64), and C₁₈H₁₄N₂O₂ (RT=13.28, RT=23.81, and RT=25.53). These compounds were mainly present in conidia. Based on metabolomic analyses, an increase in fumarylalanine was detected in apple flesh at 30 DPI (Fig. 25). Its identity was confirmed by comparing its MS/MS spectra with those reported in the literature (Steinchen et al., 2013) (Fig. S11).

4. Discussion

The velvet complex was described more than a decade ago, elucidating the role of the velvet (*veA*) gene, more than 40 years after its mutation (*veA1*) was first described in *A. nidulans* (Käfer, 1965; Bayram et al., 2008). This complex consists of three proteins (VelB, VeA, and LaeA) that are highly conserved in filamentous fungal species. LaeA is considered the most prevalent global TF controlling secondary metabolism among filamentous fungi. The many SMs whose biosynthesis is positively regulated by LaeA include sterigmatocystin / aflatoxins (Bok and Keller, 2004; Kale et al., 2008), gliotoxin (Dhingra et al., 2012), deoxynivalenol (Kim et al., 2013), citrinin (Liu et al., 2016), and monacolin K (Zhang et al., 2020). Among *Penicillium* genera, LaeA has been shown to positively regulate penicillin biosynthesis in *P. chrysogenum* and patulin biosynthesis in *P. expansum* (Kumar et al., 2016).

In many fungal species, VeA, which regulates sexual and asexual development, has also been shown to regulate secondary metabolism (Calvo, 2008). We previously showed that deletion of *veA* drastically reduced patulin and citrinin production in *P. expansum* (El Hajj Assaf et al., 2018).

VelB has been much less studied than LaeA and VeA. In *P. expansum*, only the role of *VelB* in patulin biosynthesis has been demonstrated to date (Li et al., 2019). In the present study, we confirm that *VelB* regulates patulin biosynthesis and show that it controls the production of

Table 7

Differential expressed genes (DEGs) involved in fungal development, conidiation, siderophore biosynthesis, nitrate assimilation, and ergosterol biosynthesis.

	<i>Penicillium expansum</i> d1 strain gene ID	Protein name	Log ₂ fold change PeΔ <i>velB</i> vs. WT	Adjusted <i>p</i> -value	Putative role	
Regulation of development	PEXP_050790	Fcr3	-1.38	7.42×10^{-9}	Transcription factor	
	PEXP_049080	FfbD	1.41	1.61×10^{-5}	Conidiophore development protein	
	PEXP_070520	ConF	1.74	2.44×10^{-9}	Conidiation protein	
	PEXP_089660	ConJ	-2.87	7.66×10^{-8}	Conidiation protein	
Hydrophobins	PEXP_071760	DewC	-4.49	2.45×10^{-11}		
	PEXP_098360	DewE	1.57	3.23×10^{-6}		
Velvet protein family	PEXP_092360	VeA	2.02	2.21×10^{-12}	Global transcription factor	
	PEXP_042660	LaeA	0.982	8.33×10^{-10}	Putative methyltransferase	
Siderophore biosynthesis	PEXP_104860	SidH	1.11	1.99×10^{-9}	Mevalonate enoyl-CoA hydratase	
	PEXP_104870	SidF	1.12	8.20×10^{-6}	Hydroxyornithine transacylase	
	PEXP_104880	SidT	1.62	3.95×10^{-8}	ABC transporter	
	PEXP_104890	SidD	1.88	8.84×10^{-8}	Non-ribosomal peptide synthetase	
	PEXP_104900	SidJ	1.15	2.69×10^{-6}	Fusarinine C esterase	
	PEXP_047040	SidA	0.999	6.27×10^{-6}	L-ornithine N5-oxygenase	
	PEXP_071720	SidI	1.1	3.62×10^{-5}	Mevalonyl acyl-CoA ligase	
	PEXP_078820	SidE	2.13	8×10^{-5}	Fumaryl-L-alanine synthetase	
	PEXP_009060	MirD	1.02	5.98×10^{-9}	Siderochrome iron transporter MirD	
	PEXP_023020	MirB	2.37	5.85×10^{-8}	Siderochrome iron transporter MirB	
	PEXP_048020	Sit1	1.72	1.20×10^{-8}	Siderochrome iron transporter 1	
	PEXP_108730	Sit2	2.23	5.79×10^{-11}	Siderochrome iron transporter 2	
	PEXP_095130	MirC	0.426	1.46×10^{-3}	Siderochrome-iron transporter MirC	
	Nitrate assimilation	PEXP_067550	NiaD	2.09	2.63×10^{-3}	Nitrate reductase
		PEXP_067560	NiiA	1.84	4.84×10^{-4}	Nitrite reductase
		PEXP_067570	CrnA	3	7.13×10^{-4}	Nitrate transporter
	Ergosterol biosynthesis	PEXP_096100	Erg10	0.477	1.20×10^{-4}	Acetyl-CoA-acetyltransferase
		PEXP_057160	Erg13	0.93	1.95×10^{-4}	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase
		PEXP_106030	HMG	0.487	1.73×10^{-4}	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase
PEXP_090380		Erg12	0.52	2.40×10^{-4}	Mevalonate kinase	
PEXP_107680		Erg8	0.321	3.09×10^{-3}	Phosphomevalonate kinase	
PEXP_034980		Erg19	0.433	1.08×10^{-4}	Mevalonate pyrophosphate decarboxylase	
PEXP_054500		ID11	0.198	5.49×10^{-2}	Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase	
PEXP_030300		Erg20	0.146	7.69×10^{-2}	Farnesyl pyrophosphate synthetase	
PEXP_040500		Erg9	0.23	1.94×10^{-2}	Squalene synthase	
PEXP_075880		Erg1	0.459	2.00×10^{-2}	Squalene epoxidase	
PEXP_062140		Erg7	0.212	3.88×10^{-2}	Lanosterol synthase	
PEXP_027370		Erg11A	0.984	1.15×10^{-4}	14-alpha sterol demethylase	
PEXP_103680		Erg25a	1.09	1.28×10^{-5}	C4-methyl sterol oxidase	
PEXP_052220		Erg6	0.745	2.47×10^{-5}	C-24 sterol-methyltransferase	
PEXP_097970		Erg2	0.863	5.02×10^{-5}	C-8 sterol isomerase	
PEXP_062960		Erg3	1.66	1.37×10^{-6}	Sterol delta 5-6 desaturase	
PEXP_103230		Erg5b	1.91	2.92×10^{-9}	Sterol C22-desaturase	
PEXP_020190		Erg5a	0.728	6.08×10^{-6}	Sterol C22-desaturase	
PEXP_068950		Erg4	1.3	3.06×10^{-7}	C-24 sterol reductase	
PEXP_002200		SrbA	0.774	1.58×10^{-9}	Sterol regulatory element-binding protein HLH transcription factor SrbA	
PEXP_052380	SrbB	1.8	1.47×10^{-12}	Sterol regulatory element-binding protein HLH transcription factor SrbB		

several other SMs. Given that the control of LaeA and VeA over patulin biosynthesis has already been demonstrated, this strengthens the hypothesis that a functional velvet complex is required for patulin production in *P. expansum*.

Our results showed that the PeΔ*velB* strain grew like the WT strain in apples up to six DPI, then the growth rate decreased over the following eight days. This behavior is identical to that of PeΔ*veA* and PeΔ*patL* reported in previous works (Snini et al., 2016; El Hajj Assaf et al., 2018). The absence of VelB led to very low or no patulin and citrinin production. Taken together, these different observations reinforce the hypothesis that these toxins are not indispensable for successful infection of apples and that patulin and citrinin are aggressiveness factors (Snini and Mathieu, 2020; Touhami et al., 2018).

In addition to patulin and citrinin, VelB was seen to control the chaetoglobosin biosynthetic pathway where a decrease in the expression level of all genes located in the chaetoglobosin cluster and a decrease in chaetoglobosin A production were observed compared to in the WT strain, when the PeΔ*velB* strain was grown on MEA and PDA synthetic media. El Hajj Assaf et al. (2018) already demonstrated that chaetoglobosin A production is positively controlled by VeA. The PEXP_074060

gene encoding the hybrid NRPS-PKS involved in the first step of chaetoglobosin A biosynthetic pathway was shown to be down-expressed in the PeΔ*laeA* strain (Kumar et al., 2016). Taken together, these data suggest that the velvet complex regulates the production of chaetoglobosin A in *P. expansum*. By contrast, Br1A, a TF that is essential for conidiogenesis, negatively regulates the expression of this gene cluster (Zetina-Serrano et al., 2020).

VelB was also seen to regulate the expression of several backbone genes. Upregulation of PEXP_078820 was observed in the PeΔ*velB* strain (Table 7) as already reported in the PeΔ*veA* strain (El Hajj Assaf et al., 2018). The protein encoded by PEXP_078820 has high homology with SidE. Located near the fusarinine siderophore gene cluster in *A. fumigatus*, this gene was thought to be involved in the production of extracellular siderophores such as fusarinine C and triacetylfusarinine C (TAFC) but its deletion had no impact on siderophore production. Steinchen et al. (2013) identified the product of SidE as fumarylalanine. This product was isolated as a racemic compound in *P. resticulosum* now considered synonymous with *P. expansum* (Birkinshaw et al., 1942; Pittet et al., 2000). The beta-tubulin nucleic sequence of the initial strain used in the Birkinshaw et al. study had 100 % homology with the sequences of

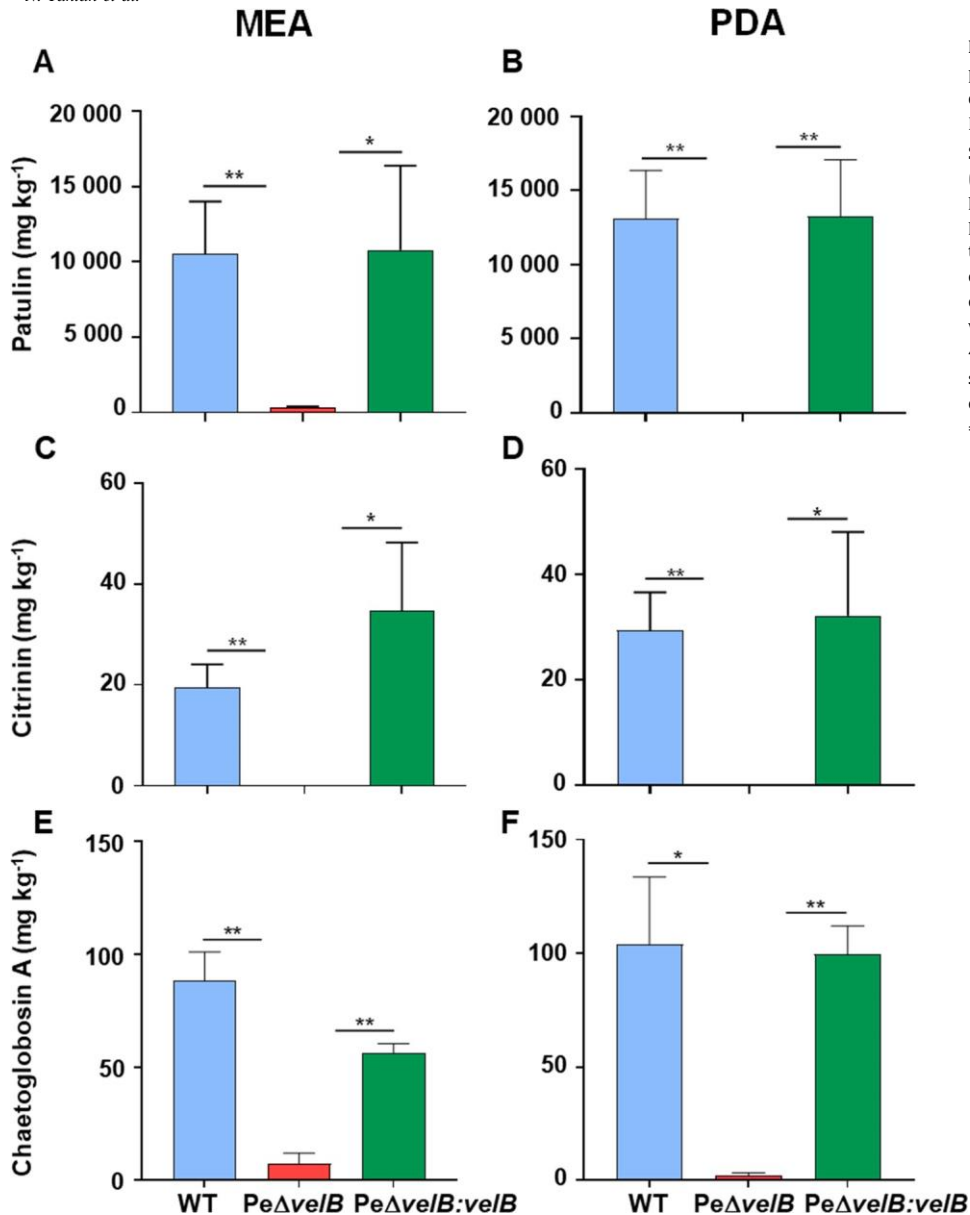


Fig. 24. Patulin, citrinin, and chaetoglobosin A production on malt extract agar (MEA) and potato dextrose agar (PDA) media by the wild type (WT), PeΔvelB, and PeΔvelB:velB strains.

Strains were grown for 7 days in the dark at 25 °C (10^{-5} L of a spore solution at 10^8 spores L⁻¹). Patulin production was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a diode array detector at 277 nm. Citrinin and chaetoglobosin A production was measured by HPLC coupled to a fluorescent detector at an excitation wavelength of 330 nm and an emission wavelength of 485 nm. Graphs show the mean ± standard error of the mean (SEM) of three replicates. **p*-value < 0.05; ***p*-value < 0.01.

P. expansum neotype (Fig. S12). We showed that VelB repressed *sidE* expression as its deletion led to increased fumarylalanine production in planta (Fig. 20). The PEXP_104890 gene encoding a SidD-like protein was upregulated in the PeΔvelB (Table 7) and PeΔveA strains. SidD is an NRPS involved in the biosynthesis of the extracellular siderophores fusarinine C and TAFC in *A. fumigatus* (Schrettl et al., 2007). Transcriptome analysis showed that other genes coding for the proteins driving siderophore biosynthesis and transport were also upregulated in the PeΔvelB.

In *A. fumigatus*, the link between extracellular siderophores and ergosterol biosynthetic pathways has already been demonstrated (Yasmin et al., 2012). Fusarinine C consists of three N5-anhydromevalonyl-N5-hydroxynornithines, TAFC being the tri-acetylated form of fusarinine C. SidI and SidH are involved in the conversion of mevalonate, an intermediate in ergosterol biosynthesis, to anhydromevalonyl (Yasmin et al., 2012). Furthermore, all genes encoding enzymes involved in ergosterol biosynthesis were upregulated in the PeΔvelB strain (Table 7), with more pronounced upregulation of ERG13, encoding hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, an early enzyme leading to mevalonate, and of enzymes involved in late steps of

the ergosterol pathway. From a regulatory perspective, *srbA* (log₂FC 0.774), encoding a basic Helix-Loop-Helix family TF, directly regulates ergosterol biosynthesis and iron uptake via siderophore production and transport in *A. fumigatus* (Chung et al., 2014). The above works also led to the discovery of another sterol regulatory element binding protein, SrB. A gene orthologous to *srbB* exists in *P. expansum* and we showed that VelB repressed the expression of the latter since *velB* deletion also led to upregulation of *srbB* at a greater magnitude (log₂FC 1.8) (Table 7). Interestingly, SrB and SrB also regulate the nitrate assimilation pathway in *A. fumigatus* (Chung et al., 2014). Similarly, our results suggest that VelB repressed both *srbA* (Table 7) and *srbB* in *P. expansum*, which in turn controlled iron uptake, nitrate assimilation, and ergosterol biosynthesis.

PEXP_015170, a gene orthologous to *A. fumigatus pes1* gene, encoding an NRPS, is also repressed by VelB whereas it is positively regulated by VeA (El Hajj Assaf et al., 2018). Although the product of this NRPS is still not known, it is conserved in all species of Eurotiales and Onygenales. A previous study showed that Pes1 is essential for the production of fumigaclavine C in *A. fumigatus* spores, although no step in the fumigaclavine C biosynthetic pathway requires an NRPS (O'Hanlon

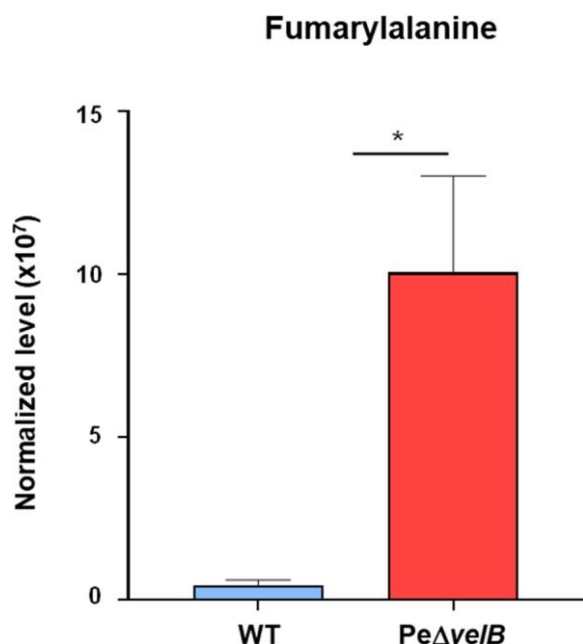


Fig. 25. Relative quantification by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry of fumarylalanine in apple flesh from 30 days post-inoculation in apples inoculated with the WT and PeΔvelB strains and kept at 25 °C in the dark. Graphs show the mean ± standard error of the mean (SEM) of three replicates. * *p*-value < 0.05.

et al., 2012). Pes1 also confers protection against oxidative stress in the same fungal species (Reeves et al., 2006). Interestingly, the Δ*pes1* strain exhibits altered surface morphology of conidia and attenuated hydrophobicity (Reeves et al., 2006), suggesting abnormalities in the profile of the hydrophobins produced (Grünbacher et al., 2014). We observed that VelB regulated the expression of some hydrophobin-encoding genes such as *dewC* and *dewE*. VelB also differentially regulated the genes *conF* and *conJ*. In *A. nidulans*, ConF and ConJ are expressed during the formation of conidia (Suzuki et al., 2013). In *P. expansum*, we observed that VelB repressed *conF* but positively regulated *conJ*.

A previous study showed that VeA is required for the fungus to pierce the fruit epicarp to complete its life cycle (El Hajj Assaf et al., 2018) while conversely, deletion of the *bra1* gene does not prevent the fungus from exiting the apple (Zetina-Serrano et al., 2020). We observed no impairment in the perforation of the apple wall and the exit of

P. expansum from the fruit in the PeΔvelB strain. This observation suggests that VeA and VelB do not work together in the exit of *P. expansum* from the apple and that the velvet complex does not control this stage of the life of the fungus. VeA is also part of the phytochrome white-collar complex that contains the light regulator complex (VeA-F-pha-LreA-LreB) involved in light sensing in filamentous fungi (Pursch-witz et al., 2008). Interestingly, constant exposure to light has been shown to lead to the inability of the WT strain to pierce the apple wall (El Hajj Assaf et al., 2018), suggesting that the latter complex controls the exit of the fungus from the fruit.

VipA, a novel VeA-interacting protein, was recently identified in *A. nidulans*, increasing the number of VeA-interacting proteins (Röhrig et al., 2017). Although BLAST analysis showed that there is no orthologous gene in the *P. expansum* genome, this discovery suggests other protein interactions involving VeA may take place in this species.

5. Conclusion

The present work shed light on the roles of VelB in a necrotrophic fungal species, *P. expansum*. Our results demonstrate that VelB was involved in regulating the development of this postharvest fungus, both

on synthetic media and on the 'Golden Delicious' cultivar. The absence of VelB affected the aggressiveness of *P. expansum* in planta. In addition, a decrease in conidiation and spore viability was detected in the PeΔvelB strain compared to the WT strain; an observation pointing to the implication of VelB in conidiation in *P. expansum*. This protein also plays an important role in regulating secondary metabolism in *P. expansum* as it positively or negatively controls several SM biosynthetic pathways. For instance, the clusters of patulin, citrinin, and chaetoglobosin A have been shown to be positively regulated, whereas the cluster of fumar-ylalanine has been shown to be negatively regulated by this protein both in vitro and in planta. The results of the present study show that VelB not only influences secondary metabolism but also represses iron uptake, nitrate assimilation, ergosterol biosynthesis but also regulates conidiogenesis.

CRediT authorship contribution statement

Nadia Tahtah: Investigation, Formal Analysis, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing. Chrystian Zetina-Serrano: Investigation. Ophélie Rocher: Investigation. Claire Naylies: Investigation. Yannick Lippi: Data Curation. André El Khoury: Writing - Review & Editing. Ali Atoui: Writing - Review & Editing. Emilien L. Jamin: Formal Analysis. Isabelle P. Oswald: Writing - Review & Editing, Project administration. Sophie Lorber: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Project administration, Funding acquisition. Olivier Puel: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal Analysis, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition. All authors read and approved the final manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

The link is included in the manuscript.

Acknowledgements

This research was funded by CASDAR AAP RT 794 2015, France, grant number 1508, and by French National Research Agency PATRISK project, France (grant number ANR-17-CE21-0008). Nadia Tahtah was supported by doctoral fellowship from CNRS/ Saint-Joseph University, Lebanon and by funds from Animal Health department of INRAE, France.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.postharvbio.2022.112121](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112121).

References

- Andersen, B., Smedsgaard, J., Frisvad, J.C., 2004. *Penicillium expansum*: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2421–2428. <https://doi.org/10.1021/jf035406k>.
- Baert, K., Devlieghere, F., Flyps, H., Oosterlinck, M., Ahmed, M., Rajkovic, A., Verlinden, B., Nicolai, B., Debevere, J., De Meulenaer, B., 2007. Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 170–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.061>.
- Ballester, A.-R., Marcet-Houben, M., Levin, E., Sela, N., Selma-Lazaro, C., Carmona, L., Wisniewski, M., Droby, S., González-Candelas, L., Gabaldón, T., 2015. Genome, transcriptome, and functional analyses of *Penicillium expansum* provide new insights

- into secondary metabolism and pathogenicity. *Mol. Plant Microbe Inter.* 28, 232–248. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-14-0261-FI>.
- Barad, S., Espeso, E.A., Sherman, A., Prusky, D., 2016. Ammonia activates pacC and patulin accumulation in an acidic environment during apple colonization by *Penicillium expansum*. *Mol. Plant Pathol.* 17, 727–740. <https://doi.org/10.1111/mpp.12327>.
- Bayram, O., Braus, G.H., 2012. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 1–24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00285.x>.
- Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J.W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeyer, S., Kwon, N.-J., Keller, N.P., Yu, J.-H., Braus, G.H., 2008. VeIB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320, 1504–1506. <https://doi.org/10.1126/science.1155888>.
- Bernáldez, V., Cordoba, J.J., Rodríguez, M., Cordero, M., Polo, L., Rodríguez, A., 2013. Effect of *Penicillium natgiovense* as protective culture in processing of dry-fermented sausage "salchichón". *Food Control* 32, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.018>.
- Birkinshaw, J.H., Raistrick, H., Smith, G., 1942. Studies in the biochemistry of microorganisms: Fumaryl-dl-alanine (fumaromono-dl-alanide), a metabolic product of *Penicillium resticulosum* sp.nov. *Biochem. J.* 36, 829–835. <https://doi.org/10.1042/bj0360829>.
- Bok, J.W., Keller, N.P., 2004. LaeA, a Regulator of Secondary Metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot. Cell* 3, 527–535. <https://doi.org/10.1128/EC.3.2.527-535.2004>.
- Calvo, A.M., 2008. The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 45, 1053–1061. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.03.014>.
- Cano, P., Puel, O., Oswald, I.P., 2016. Mycotoxins: fungal secondary metabolites with toxic properties. In: Deshmukh, S.K., Misra, J.K., Tewari, J.P., Papp, T. (Eds.), *Fungi: applications and management strategies*. CRC Press, Boca Raton, pp. 318–371.
- Chang, P.-K., Scharfenstein, L.L., Li, P., Ehrlich, K.C., 2013. *Aspergillus flavus* VeIB acts distinctly from VeA in conidiation and may coordinate with FluG to modulate sclerotial production. *Fungal Genet. Biol.* 58–59, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.08.009>.
- Chung, D., Barker, B.M., Carey, C.C., Merriman, B., Werner, E.R., Lechner, B.E., Dhingra, S., Cheng, C., Xu, W., Blosser, S.J., Morohashi, K., Mazurie, A., Mitchell, T.K., Haas, H., Mitchell, A.P., Cramer, R.A., 2014. ChIP-seq and in vivo transcriptome analyses of the *Aspergillus fumigatus* SREBP SrbA reveals a new regulator of the fungal hypoxia response and virulence. *PLoS Pathog.* 10, e1004487. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004487>.
- Dhingra, S., Andes, D., Calvo, A.M., 2012. VeA regulates conidiation, gliotoxin production, and protease activity in the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* 11 (12). <https://doi.org/10.1128/EC.00222-12>.
- Dupont, J., Dequin, S., Giraud, T., Le Tacon, F., Marsit, S., Ropars, J., Richard, F., Selosse, M.-A., 2017. Fungi as source of food. *Microbiol. Spectr.* 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0030-2016>.
- EC Commission Regulation No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Available at: <https://leap.unep.org/countries/eu/national-legislation/commission-regulation-ec-no-18812006-setting-maximum-levels> [Accessed 2 June 2022].
- El Hajj Assaf, C., Snini, S.P., Tadriss, S., Bailly, S., Naylies, C., Oswald, I.P., Puel, O., Lorber, S., 2018. Impact of veA on the development, aggressiveness, dissemination and secondary metabolism of *Penicillium expansum*. *Mol. Plant Pathol.* 19, 1971–1983. <https://doi.org/10.1111/mpp.12673>.
- El Hajj Assaf, C., Zetina-Serrano, C., Tahtah, N., Khoury, A.E., Atoui, A., Oswald, I.P., Puel, O., Lorber, S., 2020. Regulation of secondary metabolism in the *Penicillium* Genus. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 9462. <https://doi.org/10.3390/ijms21249462>.
- Eom, T.-J., Moon, H., Yu, J.-H., Park, H.-S., 2018. Characterization of the velvet regulators in *Aspergillus flavus*. *J. Microbiol.* 56, 893–901. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8417-4>.
- Gao, J.-X., Yu, C.-J., Wang, M., Sun, J.-N., Li, Y.-Q., Chen, J., 2017. Involvement of a velvet protein ClVeB in the regulation of vegetative differentiation, oxidative stress response, secondary metabolism, and virulence in *Curvularia lunata*. *Sci. Rep.* 7, 46054. <https://doi.org/10.1038/srep46054>.
- Grünbacher, A., Throm, T., Seidel, C., Gutt, B., Röhrig, J., Strunk, T., Vincze, P., Walheim, S., Schimmel, T., Wenzel, W., Fischer, R., 2014. Six hydrophobins are involved in hydrophobin rodlet formation in *Aspergillus nidulans* and contribute to hydrophobicity of the spore surface. *PLoS One* 9, e94546. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094546>.
- Jiang, J., Yun, Y., Liu, Y., Ma, Z., 2012. FgVeIB is associated with vegetative differentiation, secondary metabolism and virulence in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet. Biol.* 49, 653–662. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.06.005>.
- Käfer, E., 1965. Origins of Translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52, 217–232. Kale, S.P., Milde, L., Trapp, M.K., Frisvad, J.C., Keller, N.P., Bok, J.W., 2008. Requirement of LaeA for secondary metabolism and sclerotial production in *Aspergillus flavus*. *Fungal Genet. Biol.* 45, 1422–1429. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.06.009>.
- Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W., 2005. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 937–947. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1286>.
- Kim, H.-K., Lee, S., Jo, S., McCormick, S., Butchko, R.A., Proctor, R., Yun, S.-H., 2013. Functional roles of FgLaEA in controlling secondary metabolism, sexual development, and virulence in *Fusarium graminearum*. *PLoS One* 8, e68441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068441>.
- Kim, H.Y., Park, H.M., Lee, C.H., 2012. Mass spectrometry-based chemotaxonomic classification of *Penicillium* species (*P. echinulatum*, *P. expansum*, *P. solitum*, and *P. oxalicum*) and its correlation with antioxidant activity. *J. Microbiol. Methods* 90, 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2012.06.006>.
- Kopke, K., Hoff, B., Bloemendal, S., Katschorowski, K., Kamerewerd, J., Kück, U., 2013. Members of the *Penicillium chrysogenum* velvet complex play functionally opposing roles in the regulation of penicillin biosynthesis and conidiation. *Eukaryot. Cell* 12, 299–310. <https://doi.org/10.1128/EC.00272-12>.
- Kumar, D., Barad, S., Chen, Y., Luo, X., Tannous, J., Dubey, A., Matana, N.G., Tian, S., Li, B., Keller, N., Prusky, D., 2016. LaeA regulation of secondary metabolism modulates virulence in *Penicillium expansum* and is mediated by sucrose. *Mol. Plant Pathol.* 18, 1150–1163. <https://doi.org/10.1111/mpp.12469>.
- Lan, N., Zhang, H., Hu, C., Wang, W., Calvo, A.M., Harris, S.D., Chen, S., Li, S., 2014. Coordinated and distinct functions of velvet proteins in *Fusarium verticillioides*. *Eukaryot. Cell* 13, 909–918. <https://doi.org/10.1128/EC.00022-14>.
- Li, B., Zong, Y., Du, Z., Chen, Y., Zhang, Z., Qin, G., Zhao, W., Tian, S., 2015. Genomic characterization reveals insights into patulin biosynthesis and pathogenicity in *Penicillium* species. *Mol. Plant Microbe Inter.* 28, 635–647. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-14-0398-FI>.
- Li, B., Chen, Y., Zong, Y., Shang, Y., Zhang, Z., Xu, X., Wang, X., Long, M., Tian, S., 2019. Dissection of patulin biosynthesis, spatial control and regulation mechanism in *Penicillium expansum*. *Environ. Microbiol.* 21, 1124–1139. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14542>.
- Liu, Q., Cai, L., Shao, Y., Zhou, Y., Li, M., Wang, X., Chen, F., 2016. Inactivation of the global regulator LaeA in *Monascus ruber* results in a species-dependent response in sporulation and secondary metabolism. *Fungal Biol.* 119, 870–883. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.10.008>.
- López-Berges, M.S., Hera, C., Sulyok, M., Schäfer, K., Capilla, J., Guarro, J., Di Pietro, A., 2013. The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Mol. Microbiol.* 87, 49–65. <https://doi.org/10.1111/mmi.12082>.
- Luciano-Rosario, D., Keller, N.P., Jurick II, W.M., 2020. *Penicillium expansum*: biology, omics, and management tools for a global postharvest pathogen causing blue mould of pome fruit. *Mol. Plant Pathol.* 21, 1391–1404. <https://doi.org/10.1111/mpp.12990>.
- MacDonald, S., Long, M., Gilbert, J., Felgueiras, I., 2000. Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: collaborative study. *J. AOAC Int* 83, 1387–1394. <https://doi.org/10.1093/jaoac/83.6.1387>.
- Massias, M., Rebuffat, S., Molho, L., Chiaroni, A., Riche, C., Bodo, B., 1991. Expansolides A and B: tetracyclic sesquiterpene lactones from *Penicillium expansum*. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 8112–8115. <https://doi.org/10.1021/ja00178a039>.
- O'Hanlon, K.A., Gallagher, L., Schrettel, M., Jöchl, C., Kavanagh, K., Larsen, T.O., Doyle, S., 2012. Nonribosomal peptide synthetase genes pesL and pes1 are essential for fumigaclavine C production in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3166–3176. <https://doi.org/10.1128/AEM.07249-11>.
- Park, H.-S., Ni, M., Jeong, K.C., Kim, Y.H., Yu, J.-H., 2012. The role, interaction and regulation of the velvet regulator VeIB in *Aspergillus nidulans*. *Plos One* 25 (7), e45935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045935>.
- Payros, D., Garofalo, M., Pierron, A., Soler-Vasco, L., Al-Ayoubi, C., Maruo, V.M., Allassane-Kpembé, I., Pinton, P., Oswald, I.P., 2021. Mycotoxins in human food: a challenge for research. *Cah. Nutr. Diet.* 56, 170–183. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2021a.02.001>.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*. New York, NY: Springer (3rd ed). <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>.
- Pitt, J.I., Samson, R.A., Frisvad, J.C., 2000. List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*. In: Samson, R.A., Pitt, J.I. (Eds.), *Integration of modern taxonomic methods for *Aspergillus* and *Penicillium* classification*. Harwood Academic, Amsterdam, pp. 9–49.
- Priebe, S., Kreisel, C., Horn, F., Guthke, R., Linde, J., 2015. FungiFun2: a comprehensive online resource for systematic analysis of gene lists from fungal species. *Bioinformatics* 31, 445–446. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu627>.
- Puel, O., Galtier, P., Oswald, I.P., 2010. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins* 2, 613–631. <https://doi.org/10.3390/toxins2040613>.
- Purschwitz, J., Müller, S., Kastner, C., Schöser, M., Haas, H., Espeso, E.A., Atoui, A., Calvo, A.M., Fisher, R., 2008. Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Biol.* 18, 255–259. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.01.061>.
- Reeves, E.P., Reiber, K., Neville, C., Scheibner, O., Kavanagh, K., Doyle, S., 2006. A nonribosomal peptide synthetase (Pes1) confers protection against oxidative stress in *Aspergillus fumigatus*. *FEBS J.* 273, 3038–3053. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05315.x>.
- Röhrig, J., Yu, Z., Chae, K.S., Kim, J.H., Han, K.H., Fischer, R., 2017. The *Aspergillus nidulans* Velvet-interacting protein, VipA, is involved in light-stimulated heme biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 105, 825–838. <https://doi.org/10.1111/mmi.13739>.
- Sarikaya-Bayram, O., Palmer, J.M., Keller, N., Braus, G.H., Bayram, O., 2015. One Juliet and four Romeos: VeA and its methyltransferases. *Front. Microbiol.* 6, 1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00001>.
- Schrettel, M., Bignell, E., Kragl, C., Sabiha, Y., Loss, O., Eisendle, M., Wallner, A., Arst Jr., H.N., Haynes, K., Haas, H., 2007. Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLoS Pathog.* 3, 1195–1207. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030128>.
- Snini, S.P., Mathieu, F., 2020. Biocontrol agents and natural compounds against mycotoxinogenic fungi. *Toxins* 12, E353. <https://doi.org/10.3390/toxins12060353>.
- Snini, S.P., Tannous, J., Heuillard, P., Bailly, S., Lippi, Y., Zehraoui, E., Barreau, C., Oswald, I.P., Puel, O., 2016. The patulin is a cultivar-dependent aggressiveness factor favoring the colonization of apples by *Penicillium expansum*. *Mol. Plant Pathol.* 17, 920–930. <https://doi.org/10.1111/mpp.12338>.

- Son, Y.-E., Park, H.-S., 2021. Unveiling the functions of the *vosA-velB* target gene *vidD* in *Aspergillus nidulans*. *Mycobiology* 49, 258–266. <https://doi.org/10.1080/12298093.2021.1926122>.
- Steenwyk, J.L., Shen, X.X., Lind, A.L., Goldman, G.H., Rokas, A., 2019. A robust phylogenomic time tree for biotechnologically and medically important fungi in the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *MBio* 10, e00925–19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00925-19>.
- Steinchen, W., Lackner, G., Yasmin, S., Schrettel, M., Dahse, H.M., Haas, H., Hoffmeister, D., 2013. Bimodular peptide synthetase SidE produces fumarylalanine in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6670–6676. <https://doi.org/10.1128/AEM.02642-13>.
- Strauss, J., Reyes-Dominguez, Y., 2011. Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. *Fungal Genet. Biol.* 48, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.07.009>.
- Suzuki, S., Sarikaya Bayram, Ö., Bayram, Ö., Braus, G.H., 2013. ConF and ConJ contribute to conidia germination and stress response in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 56, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.04.008>.
- Tannous, J., El Khoury, R., Snini, S.P., Lippi, Y., El Khoury, A., Atoui, A., Lteif, R., Oswald, I.P., Puel, O., 2014. Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from *Penicillium expansum*. *Int. J. Food Microbiol.* 189, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.028>.
- Tannous, J., Keller, N.P., Atoui, A., El Khoury, A., Lteif, R., Oswald, I.P., Puel, O., 2018a. Secondary metabolism in *Penicillium expansum*: Emphasis on recent advances in patulin research. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58, 2082–2098. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1305945>.
- Tannous, J., Kumar, D., Sela, N., Sionov, E., Prusky, D., Keller, N.P., 2018b. Fungal attack and host defence pathways unveiled in near-avirulent interactions of *Penicillium expansum creA* mutants on apples. *Mol. Plant Pathol.* 19, 2635–2650. <https://doi.org/10.1111/mpp.12734>.
- Tiley, A.M.M., White, H.J., Foster, G.D., Bailey, A.M., 2019. The *ZtvelB* gene is required for vegetative growth and sporulation in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Front. Microbiol.* 10, 2210. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02210>.
- Touhami, N., Soukup, S.T., Schmidt-Heydt, M., Kulling, S.E., Geisen, R., 2018. Citrinin as an accessory establishment factor of *P. expansum* for the colonization of apples. *Int. J. Food Microbiol.* 266, 224–233. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.007>.
- Wang, G., Zhang, H., Wang, Y., Liu, F., Li, E., Ma, J., Yang, B., Zhang, C., Li, L., Liu, Y., 2019. Requirement of LaeA, VeA, and VelB on asexual development, ochratoxin A biosynthesis, and fungal virulence in *Aspergillus ochraceus*. *Front. Microbiol.* 10, 2759. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02759>.
- Webster, R.H., Sil, A., 2008. Conserved factors Ryp2 and Ryp3 control cell morphology and infectious spore formation in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14573–14578. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806221105>.
- Wu, M.-Y., Mead, M.E., Lee, M.-K., Neuhaus, G.F., Adpressa, D.A., Martien, J.I., Son, Y.-E., 2021. Transcriptomic, protein-DNA interaction, and metabolomic studies of VosA, VelB, and WetA in *Aspergillus nidulans* asexual spores. *e03128-20 MBio* 12. <https://doi.org/10.1128/mBio.03128-20>.
- Yang, Q., Chen, Y., Ma, Z., 2013. Involvement of BcVeA and BcVelB in regulating conidiation, pigmentation and virulence in *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* 50, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.10.003>.
- Yasmin, S., Alcazar-Fuoli, L., Gründlinger, M., Puempel, T., Cairns, T., Blatzer, M., Lopez, J.F., Grimalt, Bignell, E., Haas, H., 2012. Mevalonate governs interdependency of ergosterol and siderophore biosyntheses in the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (8), E497–E504. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106399108>.
- Zetina-Serrano, C., Rocher, O., Naylies, C., Lippi, Y., Oswald, I.P., Lorber, S., Puel, O., 2020. The *briA* gene deletion reveals that patulin biosynthesis is not related to conidiogenesis in *Penicillium expansum*. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6660. <https://doi.org/10.3390/ijms21186660>.
- Zhang, C., Zhang, H., Zhu, Q., Hao, S., Chai, S., Li, Y., Jiao, Z., Shi, J., Sun, B., Wang, C., 2020. Overexpression of global regulator LaeA increases secondary metabolite production in *Monascus purpureus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 3049–3060. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10379-4>.
- Zhang, F., Xu, G., Geng, L., Lu, X., Yang, K., Yuan, J., Nie, X., Zhuang, Z., Wang, S., 2016. The stress response regulator AfiSkn7 influences morphological development, stress response, and pathogenicity in the fungus *Aspergillus flavus*. *Toxins* 8, 202. <https://doi.org/10.3390/toxins8070202>.
- Zhang, G., Zheng, Y., Ma, Y., Yang, L., Xie, M., Zhou, D., Niu, X., Zhang, K.-Q., Yang, J., 2019. The velvet proteins VosA and VelB play different roles in conidiation, trap formation, and pathogenicity in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Front. Microbiol.* 10, 1917. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01917>.
- Zhao, Y., Lee, M.-K., Lim, J., Moon, H., Park, H.-S., Zheng, W., Yu, J.-H., 2021. The putative sensor histidine kinase VadJ coordinates development and sterigmatocystin production in *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol.* 59, 746–752. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-1055-2>

Supporting Information

Implication of VelB in the development, pathogenicity, and secondary metabolism of *Penicillium expansum*

Nadia Tahtah^a, Chrystian Zetina-Serrano^a, Ophélie Rocher^a, Claire Naylies^a, Yannik Lippi^a, André El Khoury^b, Ali Atoui^c, Emilien L. Jamin^a, Isabelle P. Oswald^a, Sophie Lorber^a, Olivier Puel^{a*}

^aToxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

^bCentre d'Analyses et de Recherche (CAR), Unité de Recherche Technologies et Valorisation Agro-Alimentaire (UR-TVA), Faculty of Sciences, Saint-Joseph University of Beirut, Campus of Sciences and Technologies, Beirut P.O. Box 17-5208, Lebanon.

^cLaboratory of Microbiology, Department of Life and Earth Sciences, Faculty of Sciences, Lebanese University, Hadath Campus, Beirut P.O. Box 5, Lebanon.

*Correspondence: Olivier Puel

olivier.puel@inrae.fr

Tel.: +33 582 066 336

Construction and characterization of the null mutant *PeΔvelB* strain

Creation of a linear transformation cassette using double-joint PCR

In order to determine the role of the *velB* gene, a null mutant *PeΔvelB* was created by eliminating the *velB* gene. To do so, the *velB* coding region was replaced by the hygromycin resistance marker in the wild type NRRL 35695 (WT) strain of *Penicillium expansum* by homologous recombination. The strategy used for the construction of the null mutant has been previously described (Zetina-Serrano et al., 2020b). Specific primers of the *velB* gene were designed from the *P. expansum* strain d1, sequence deposited in GenBank (PEXP_065290). The primers are listed in Table S1. For all PCR amplifications, the Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) was used.

At the locus of interest, the 5' upstream and 3' downstream flanking regions were used as complementary sequences to promote homologous recombination. PCR and double-joint PCR were respectfully used to amplify the fragments necessary for the construction of the gene disruption marker and then to assemble them.

The primer pair 5fdebVelBPex / DebVelBPex1Rhygro was used to amplify a 1,097 bp DNA fragment that corresponds to the promoter and the 5' untranslated region of the *velB* gene while the primer pair FinVelBPex1Fhygro / 3rfinVelBPex was used to amplify a 988 bp fragment that corresponds to the 3' untranslated region of the *velB* gene, using the genomic DNA of the WT strain. A 4,107 bp fragment of pAN 7.1 plasmid (access number Z32698) containing the hygromycin (*hph*) resistance gene was amplified using the primer pair *velBhphF1* / *velBhphR1*.

Two sequences, similar to those at the extremities of the PCR product induced by the primer pair *hphF1* / *hphR1*, were added to the ends in the *DebVelBPex1Rhygro* and *FinVelBPex1Fhygro* (underlined sequences in Table S1). These sequences allowed binding between PCR products.

To allow amplification of the 5' and the 3' junctions, the following PCR program was used: a 45 s denaturation step at 98 °C was followed by 40 amplification cycles, consisting for each cycle of a denaturation step of 45 s at 98 °C, an annealing step of 45 s at 61 °C, and an extension step of 60 s and 15 s at 72 °C. The final step of the program consisted of an extension for 600 s at 72 °C. For the amplification of the hygromycin resistance marker, a similar PCR program was used with two slight modifications: the annealing temperature was 62 °C and the extension cycle lasted 120 s. In order to purify the amplicons, a GenElute™PCR Clean-Up Kit (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used. The protocol used was that described by the manufacturer.

The next step consisted in the assembly of the three fragments generated. To do so, double-joint PCR was used, as previously described by Zetina-Serrano et al. (2020). Briefly, at a ratio of 1:2:1, the three amplicons (flank 5': marker: flank 3') were firstly used in a primerless PCR reaction, thus resulting in the assembly of the flanking regions, the resistance marker, the single-union as well as the double union product. For this purpose, the following program was applied: a first single 300 s denaturation step at 98 °C was followed by 12 PCR cycles, a denaturation step of 45 s at 98 °C, a 120 s annealing step at 60 °C, and a 180 s extension step at 64 °C. The final step consisted of an extension for 300 s at 64 °C.

In order to amplify the double-union product exclusively, the *dVelB-NestedF* / *dVelB-NestedR* nested primer pair was used and the following PCR program was applied: a 300 s denaturation step at 98 °C was followed by a denaturation step of 45 s at 98 °C, a 30 s annealing step at 65 °C, and a 180 s extension step at 68 °C. A temperature gradient was applied: for each cycle, the annealing temperature decreased by 0.5 °C until reaching a temperature of 62 °C. After that, 24 amplification cycles, consisting each of a denaturation step of 45 s at 98 °C, followed by a 30 s

annealing step at 62 °C, and a 180 s extension step at 68 °C were performed. The final step consisted of a 300 s extension at 64 °C.

At the end of this PCR, a 6,192 bp fragment containing all three amplicons fused together in the right order was created. Based on the protocol previously described (Snini et al., 2016), this product was used to allow transformation of the protoplasts prepared from the WT strain.

For the creation of the complemented strain, the genomic DNA fragment was generated using the primer pair dVelB-NestedF / dVelB-NestedR and thereafter used to transform the protoplasts of the null mutant *PeΔ*velB** strain.

SUPPLEMENTARY TABLE 1. Primers used for the construction and the validation of the deletion mutant *PeΔvelB* strain.

Primer	Sequence 5' → 3'
5fdebVelBPex	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGGTTACCACACGATCGGGACCTGT C
DebVelBPex1Rhygro¹	GAGCCTGTGTGTAGAGATAACAAGGGAATTC <u>GTTACCACACGATCGGGACCT</u> <u>GTC</u>
FinVelBPex1Fhygro¹	GTGTAAGCGCCCACTCCACATCTCCACTCGAAGAGCAATTCTTTGATCCATAG <u>TGCACTGCG</u>
3rfinVelBPex	GCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGCGAACGGGGTGAGGATGGGCAG <u>AG</u>
velBhphF1	CCGTCGTTTATCTATCAGTCATCCTCGGGAATTCCTTGTATCTCTACACAGA GGCTC
velBhphR1	CGCAGTGCCTATGGATCAAAGAATTGCTCTTCGAGTGGAGATGTGGAGTG GGCG
dVelB-NestedF	CATTGGTAATCAGTTCTGGAGTTTCGGAG
dVelB-NestedR	GCGCAGTTGGGTGATTGGAATCAG
dvelB-geneF	CCGTCCAGTACCCGTCGGG
dvelB-geneR	CCATCTCCACCTCGGCGGG
Hyg5'1 R	CTTGACACCGCTCCGTCCTCC
Hyg3'1 F	GGGTTTACCTCTTCCAGATACAGCTC
dVelB-5'F	GATCGACCAGGTAATGACTTGTGCATTC
dVelB-3'R	GCCTTGACAGATACCAGCCAGGC
GWvelB 5'1²	ATCGGGGCATTCTCGGAGCCGTGTAC
GWvelB 5'2²	ATTCTCGGAGCCGTGTACATTACTTACAGC
GWvelB 3'1²	ATGAACCTCAACTAACTCCCCACGTCCG
GWvelB 3'2²	CGTCGGACAATGTACAACGCCCGTGG
VelB_F2³	CGGACAGAAGGCACTTTCCGTC
VelB_R2³	CAGAGAAAACCGATGCTAGAACGGG
Pexp_btub Forward³	TGAACGTCTACTTCAACCATGCC
Pexp_btub Reverse³	CCAAATCGACGAGAACGG

¹The underlined sequences added to the 5' and 3' ends were identical to the ends of the PCR product generated by the hphF1/hphR1 primers.

²Primers used for genome walking validation.

³Primers used in qPCR validation.

Validation of the Null Mutant *PeΔvelB* strain

Polymerase chain reaction (PCR) and genome walking

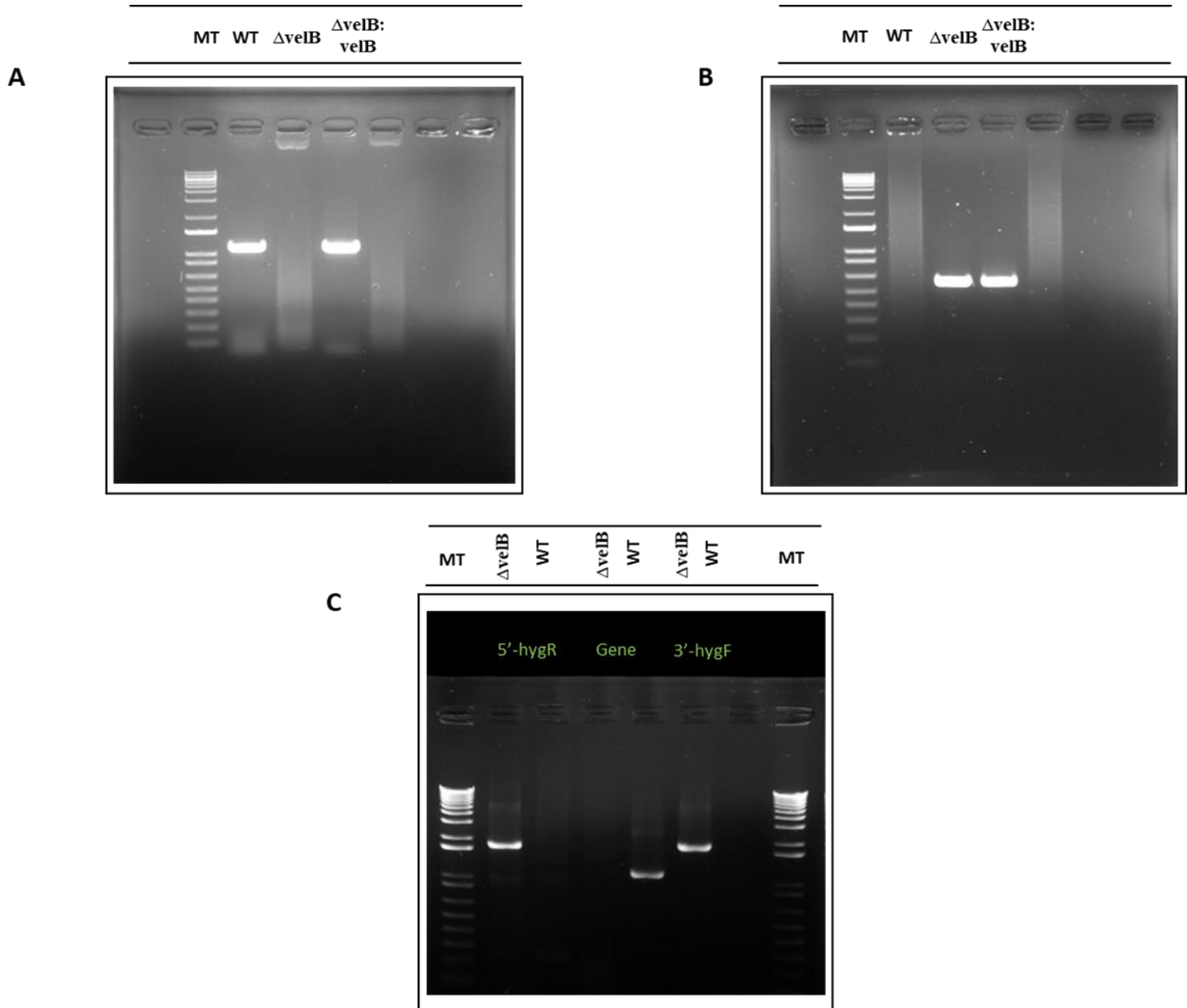
In order to verify the replacement of the *velB* gene by the hygromycin resistance marker at the locus of interest, a PCR reaction was first performed to confirm the insertion of the deletion cassette. As a first step, genomic DNA was extracted and then used to detect the absence of the *velB* gene by PCR screening (Moore et al., 2018). For that, the specific primer pair dvelB-geneF / dvelB-geneR was used and the following PCR program was applied: 35 cycles consisting of a denaturation step of 45 s at 98 °C, a 45 s annealing step at 62 °C, an extension step of 60 s and 30 s at 72 °C. A final extension step of 600 s at 72 °C was performed. This PCR was realized in order to select the null mutants. PCR generated a fragment of 1,109 base pairs (bp) for the WT strain and no fragment for the null mutant *PeΔvelB* strain (Figure S1A). PCR generated a fragment of 584 bp for the null mutant *PeΔvelB* strain and no fragment for the WT strain using the hygF and hygR primers, specific to the hygromycin sequence (Figure S1B). The PCR conditions were previously described by Snini et al. (2016). To check that the deletion cassette was inserted at the locus of interest, the next step consisted in a PCR amplification conducted on the hereby selected transformants, and using the hygromycin specific primer pair dVelB-5'F / Hyg5'1R located at the 5' upstream and 3' downstream junctions of the disruption cassette and Hyg3'1F/ dVelB-3'R, located inside the hygromycin marker. The PCR conditions used were as follows: 35 cycles consisting each of a denaturation step of 45 s at 98 °C, a 45 s annealing step at 62 °C, and a 120 s extension at 72 °C; a final extension step of 600 s at 72 °C was performed. For the two PCR reactions described above, the Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) and the Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) were respectively used. The replacement of *velB* by *hph* was confirmed by the amplification of the 5' and 3' locus *velB/hph* junctions in the *PeΔvelB* strain that generated fragments of 1,697 bp and 1,700 bp (Figure S1C).

After this first verification by PCR, a verification by genome walking (GenomeWalker Universal Kit, Takara Bio Europe SAS, Saint-Germain-en-Laye, France) was performed. This method consists in using a known genomic DNA sequence to identify unknown adjacent sequences. It is applied to validate the single insertion of the cassette at the *velB* locus of *P. expansum*. The protocol used was that recommended by the manufacturer. As a first step, the restriction enzyme PvuII was used to digest aliquots of 2.5×10^{-6} g of genomic DNA, overnight. After that, the digested genomic DNA was ligated to the GenomeWalker adaptors. This step allows the construction of so-called 'libraries' that correspond to uncloned genomic DNA fragments ligated to adaptors.

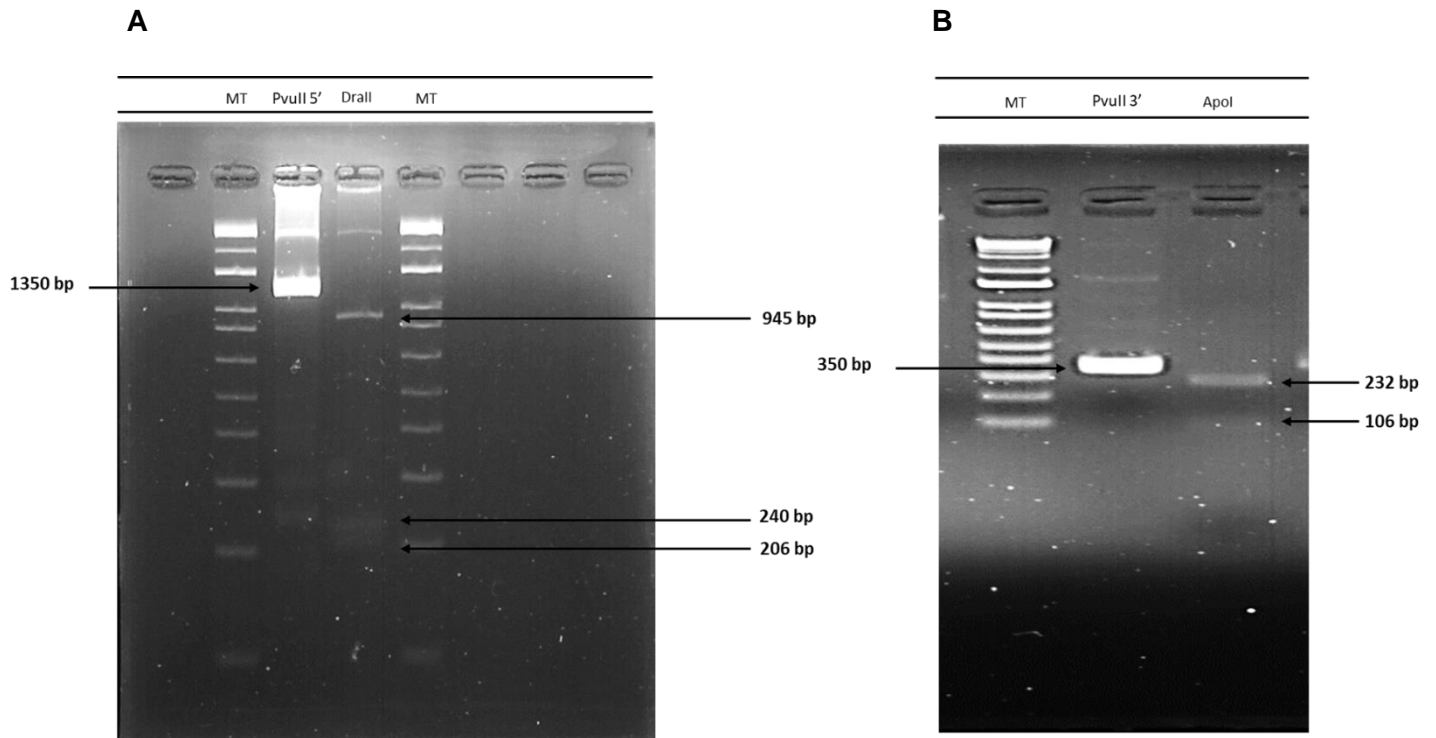
Once the libraries constructed, two PCR amplifications were carried out. A primary PCR, using AP1, the kit's adaptor primer as well as GWVelB5'1 and GWVelB3'1, two external gene-specific primers designed respectively from the 5' and the 3' end sequences of the disruption cassette. The PCR program used was divided into two cycles as follows: the first cycle, repeated seven times, consisted in a denaturation phase of 25 s at 94 °C followed by a 180 s annealing/extension step at 72 °C, whilst the second cycle, repeated 32 times, consisted in a denaturation phase of 25 s at 94 °C and a 180 s extension step at 67 °C followed by a final 420 s incubation phase at 67 °C. This primary PCR resulted in an amplicon that was used as a template for the secondary (nested) PCR, after being diluted (1:50). The primers used in this nested PCR were AP2, the nested adaptor primer as well as GWVelB5'2 and GWVelB3'2. Similarly to the primary PCR, the PCR program was divided into two cycles, repeated five and 20 times respectively, as follows: the first cycle consisted in a denaturation phase of 25 s at 94

°C followed by a 180 s annealing/extension step at 72 °C, whilst the second cycle consisted in a denaturation phase of 25 s at 94 °C and a 180 s extension step at 67 °C followed by a final 420 s incubation phase at 67 °C. The Advantage 2 Polymerase Mix (Takara Bio Europe SAS) was put to use for the realization of the PCR amplifications. All primer sequences are presented in Table S2. The PvuII 5' library generated only one amplicon of 1 350 bp (Figure S2A), while the PvuII 3' library generated only one amplicon of 350 bp (Figure S2B). The fragments were checked by (i) restriction cutting according to the restriction map generated from the d1 strain DNA genomic sequence deposited in GenBank (IQFY01000048.1) and (ii) sequencing. The PCR products obtained from the PvuII5' and PvuII3' libraries were cut by DraII and ApoI respectively. DraII produced fragments of 945, 240, 206 from PvuII5' PCR product (Figure S2A). The restriction enzyme ApoI was used for the PCR product obtained from the PvuII3' fragment and produced fragments of 232 and 106 bp (Figure S2B).

The GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Merck KGaA) was used to purify the fragments obtained by the nested PCR in order to perform two sequencing reactions by the Microsynth sequencing laboratory (Vaulx-en-Velin, France), using the primers AP2 and GSP2.



SUPPLEMENTARY FIGURE 1. Validation of deletion and complementation by PCR analyses of genomic DNA of *Penicillium expansum* wild-type NRRL 35695 (WT), null mutant *Pe $\Delta velB$* , and complemented *Pe $\Delta velB: velB$* strains. A) PCR amplification of the *velB* gene from genomic DNA of the wild type NRRL 35695 (WT), null mutant *Pe $\Delta velB$* and complemented *Pe $\Delta velB: velB$* strains using the primer pair dVelB-geneF / dVelB-geneR. The size of the fragment amplified from the genomic DNA of the WT and complemented strains is 1,109 bp. Results showed the absence of the *velB* gene in the null mutant strain. B) PCR amplification using the primer pair hygF/hygR that showed the incorporation of the hygromycin cassette in the genome of the null mutant *Pe $\Delta velB$* strain with a predicted 584 kb PCR product and the absence of amplification in the wild type and complemented strains. C) Primers, lane 1 and 2: dVelB-5'F / Hyg5'1 R, lane 3 and 4: dVelB-geneF / dVelB-geneR and lane 5 and 6: Hyg3'1 F / dVelB -3'R. The presence of the disruption cassette *$\Delta velB$* at the *velB* locus was confirmed in the null mutant strain that amplified fragments of 1,697 bp and 1,700 bp. No amplification was observed in the wild type for PCR with the primer pairs dVelB-5'F / Hyg5'1 R and Hyg3'1 F / dVelB -3'R. In addition, the presence of the *velB* gene was not detected in the null mutant strain, while the WT strain produced an amplicon of 1,109 bp. MT Lane: 1 kb plus DNA ladder.



SUPPLEMENTARY FIGURE 2. Genome walking (GW) analyses of genomic DNA of *Penicillium expansum* wild type NRRL 35695 and null mutant *PeΔvelB* strains. A) Lane 1: PCR product with the primers AP2-GWVelB5'2 from the PvuII (1,350 bp) library. Lane 2: Enzymatic digestion of the PvuII5' library amplicon with the enzyme DraII (945, 240, 206 bp). B) Lane 1: PCR product with the primers AP2-GWVelB3'2 from the PvuII (350 bp) library. Lane 2: Enzymatic digestion of the PvuII3' library amplicon with the enzyme ApoI (232 and 106 bp). MT Lane : 1 kb plus DNA ladder.

Quantitative real-time PCR Validation

A qPCR analysis was carried out with the aim of investigating each transformant strain's gene expression. For that purpose, a pre-culture of the WT, null mutant *PeΔvelB*, and complemented *PeΔvelB: velB* strains was realized on MEA medium. A spore suspension of each strain was then prepared at a concentration of 10^9 conidia/L, of which 10^{-5} L were used to inoculate Petri dishes containing MEA medium and covered with a sterile cellophane layer. After an incubation period of 5 days (d) at 25 °C and in the dark, total RNA was isolated.

For that, $1.10-1.20 \times 10^{-4}$ kg of mycelium from each strain, was separated from the cellophane layer, weighed and then transferred to lysing matrix D tubes (1.4×10^{-3} m ceramic spheres, Thermo Fisher Scientific). Then, 7.6×10^{-4} L of lysis buffer (7.5×10^{-4} L of RLT buffer (Rneasy mini kit, QIAGEN, Courtaboeuf, France) in addition to 10^{-5} L of β -mercaptoethanol (Merck KGAA) were added to the mycelium and the tubes were directly placed in liquid nitrogen. A Precellys homogenizer (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) was used to allow homogenization of the mycelium cells. Three grindings were applied: a first one at 6,500 rpm for 15 s, a second one at 6,500 rpm for 25 s, and a third one at 6,500 rpm for 15 s. After each grinding program, the samples were placed 300 s on ice. The next step consisted in a centrifugation at 16,000 g at 4 °C for 600 s after which the supernatants were extracted and placed in QIAshredder spin columns (QIAGEN) and treated as previously described (Tannous et al., 2014b). Once the total RNA extracted, it was purified using gDNA-eliminator mini-columns (QIAGEN). RNA quality and concentration were respectfully assayed by gel electrophoresis (1.2% agarose) and by a NanoDrop ND1000 (Labtech, Palaiseau, France). The final RNA concentrations were around 292-335 mg/L ($A_{260/280} = 2.08$), 285-457 mg/L ($A_{260/280} = 1.98$) and 746-1 012 mg/L ($A_{260/280} = 2.2$) for the WT, null mutant *PeΔvelB* and complemented *PeΔvelB: velB* strains respectively.

According to the protocol previously detailed (Caceres et al., 2016), the reverse transcription was realized using 10^{-5} L of RNA at a concentration of 153 mg/L with 10^{-6} L of oligo (dT) Bys 3' Primer: (5'-GCTGTCAACGATACGCTATAACGGCATGACAGTGTTTTTTTTT-3').

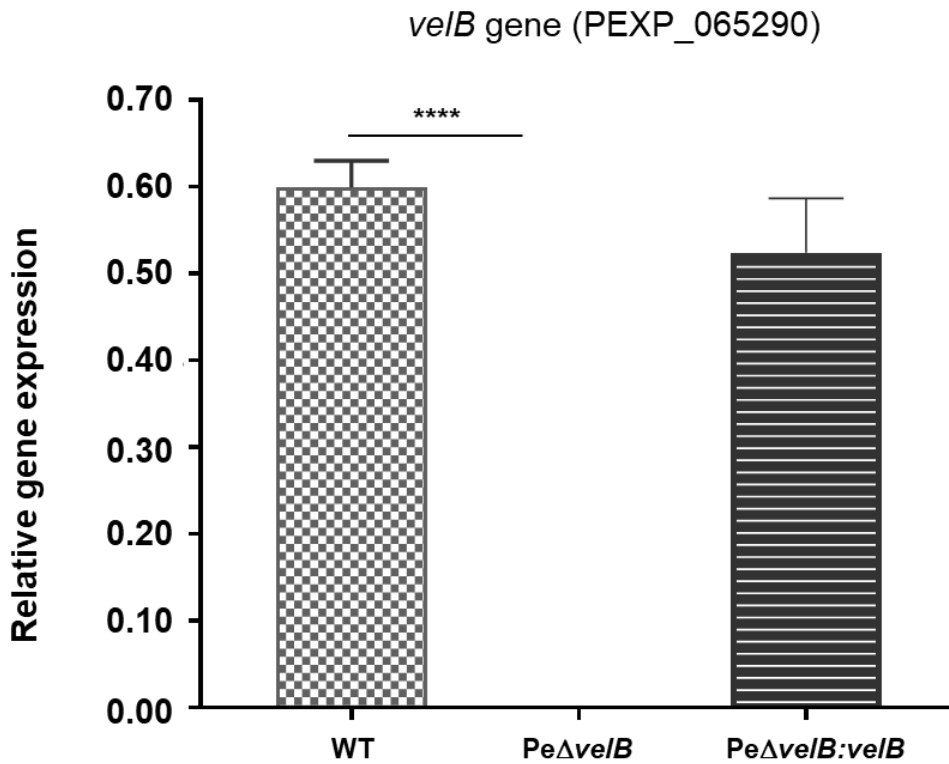
To perform the qPCR experiment, a three-step cycling was applied with a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). To amplify 50-100 bp of the *velB* gene, the primer pair *VelB_F2 / VelB_R2* was used. The reference gene used in this experiment was the *benA* gene (coding for \square -tubulin). Design and validation of the primers was realized as previously described (Caceres et al., 2016) (sequences in Table S2 of this Supporting Information).

For PCR amplification, 5×10^{-6} L of DNA template, 12.5×10^{-6} L of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), and 7.5×10^{-6} L of primer mix (300 nM for the reference *benA* gene and 300 nM for the *velB* F/R primers) were used.

The program applied was as follows: a 600 s denaturation phase at 95 °C was followed by 40 cycles, consisting of a denaturation step of 15 s at 95 °C and a 60 s annealing phase at 60 °C. A final extending step of 15 s at 95 °C, 60 s at 60 °C, 15 s at 95 °C and 15 s at 60 °C was performed for analysis of melt curves. Results were analyzed using the 7300 System SDS Software (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) (Figure S3).

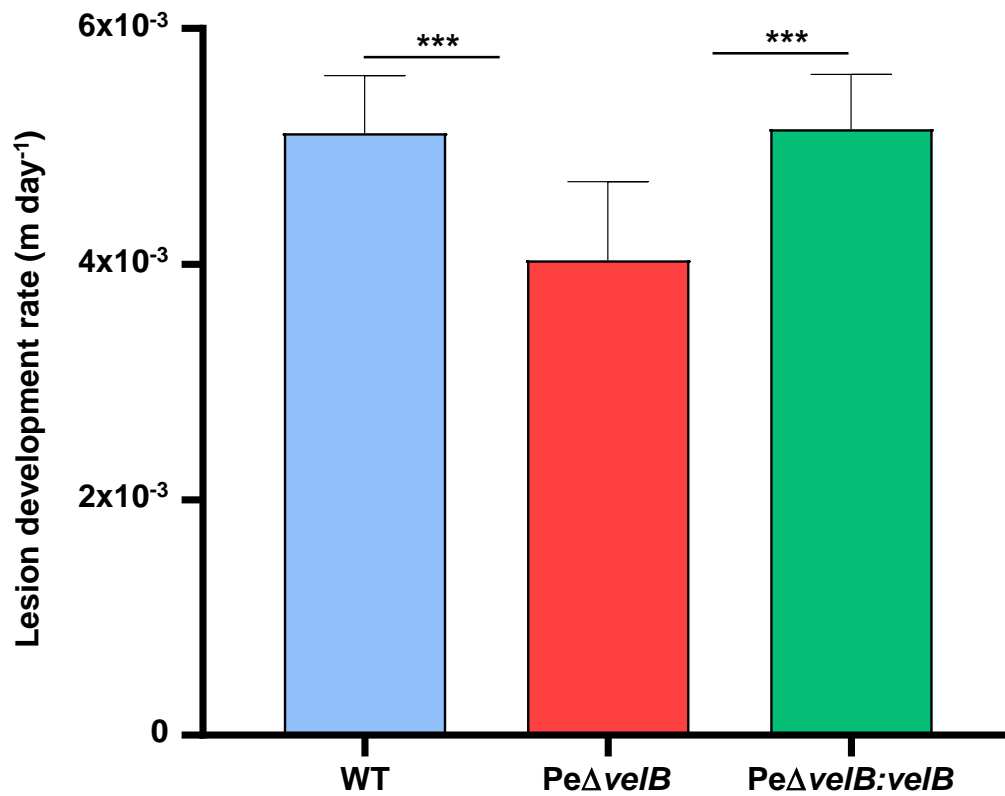
The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, described by Livak and Schmittgen (2001), was applied to analyze changes in gene expression. Statistical analysis consisted in using the Student's t-test with the GraphPad 4 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Changes were considered to be

statistically significant for a p -value < 0.05 . All experiments were performed using four biological replicates for each strain.



SUPPLEMENTARY FIGURE 3. Validation of the mutant by quantitative real-time PCR analysis. The expression of the *velB* gene was assessed in *Penicillium expansum* wild type NRRL 35695, in the null mutant *PeΔvelB*, and in the complemented *PeΔvelB:velB* strains. GraphPad 4 Software was used for statistical analysis and a Student's t-test was realized. The graph shows the mean ± standard error of the mean (SEM) using four biological replicates. **** p -value <0.0001.

Daily development of lesion

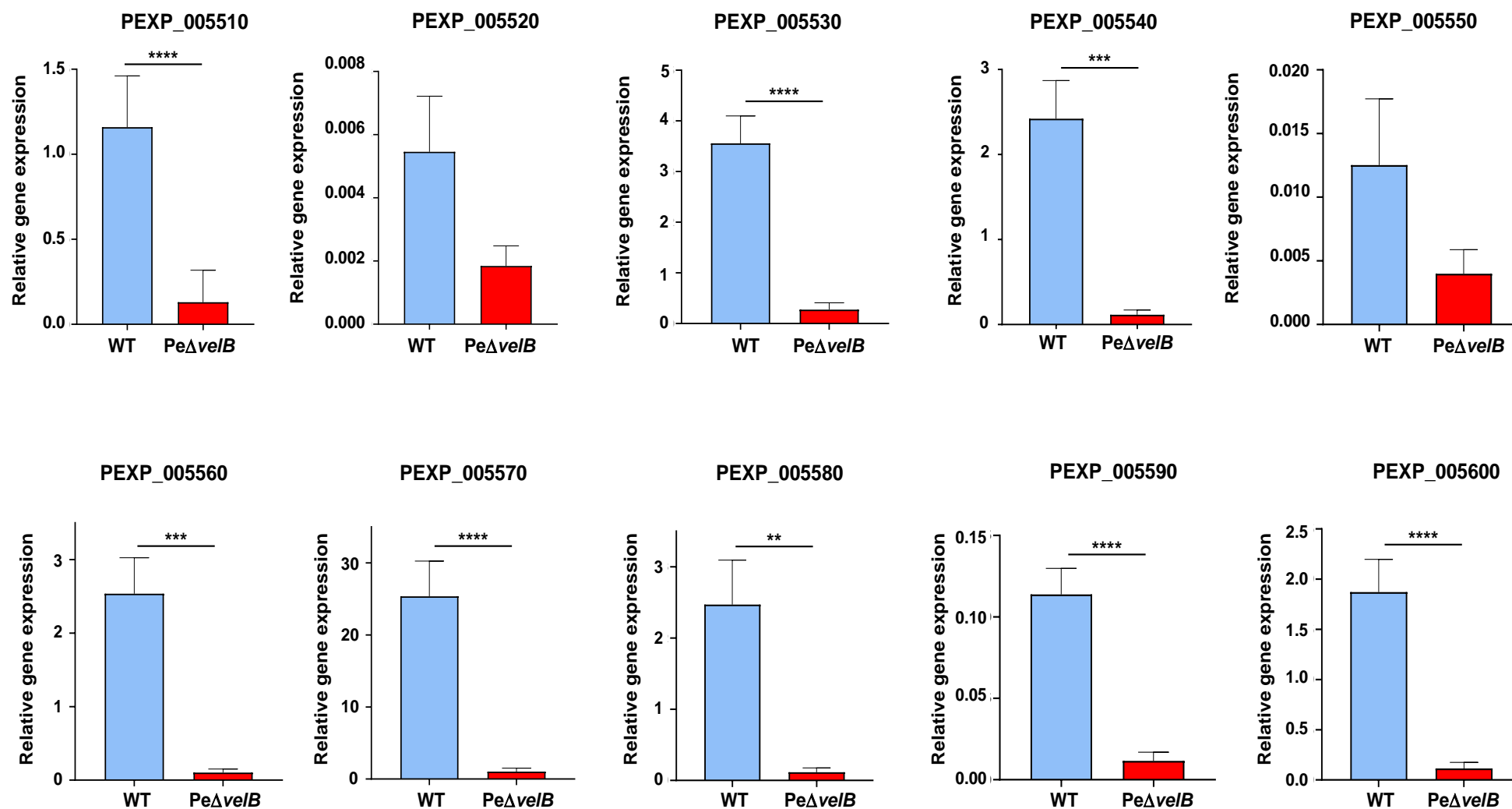


SUPPLEMENTARY FIGURE 4. Rot growth rates obtained from ‘Golden Delicious’ apples infected with *Penicillium expansum* wild type NRRL 35695, the null mutant PeΔ*velB*, and the complemented PeΔ*velB*:*velB* strains. Apples were stored for 14 d at 25 °C in the dark. The graph shows the mean ± standard error of the mean (SEM) from nine biological replicates. *** *p*-value < 0.001.

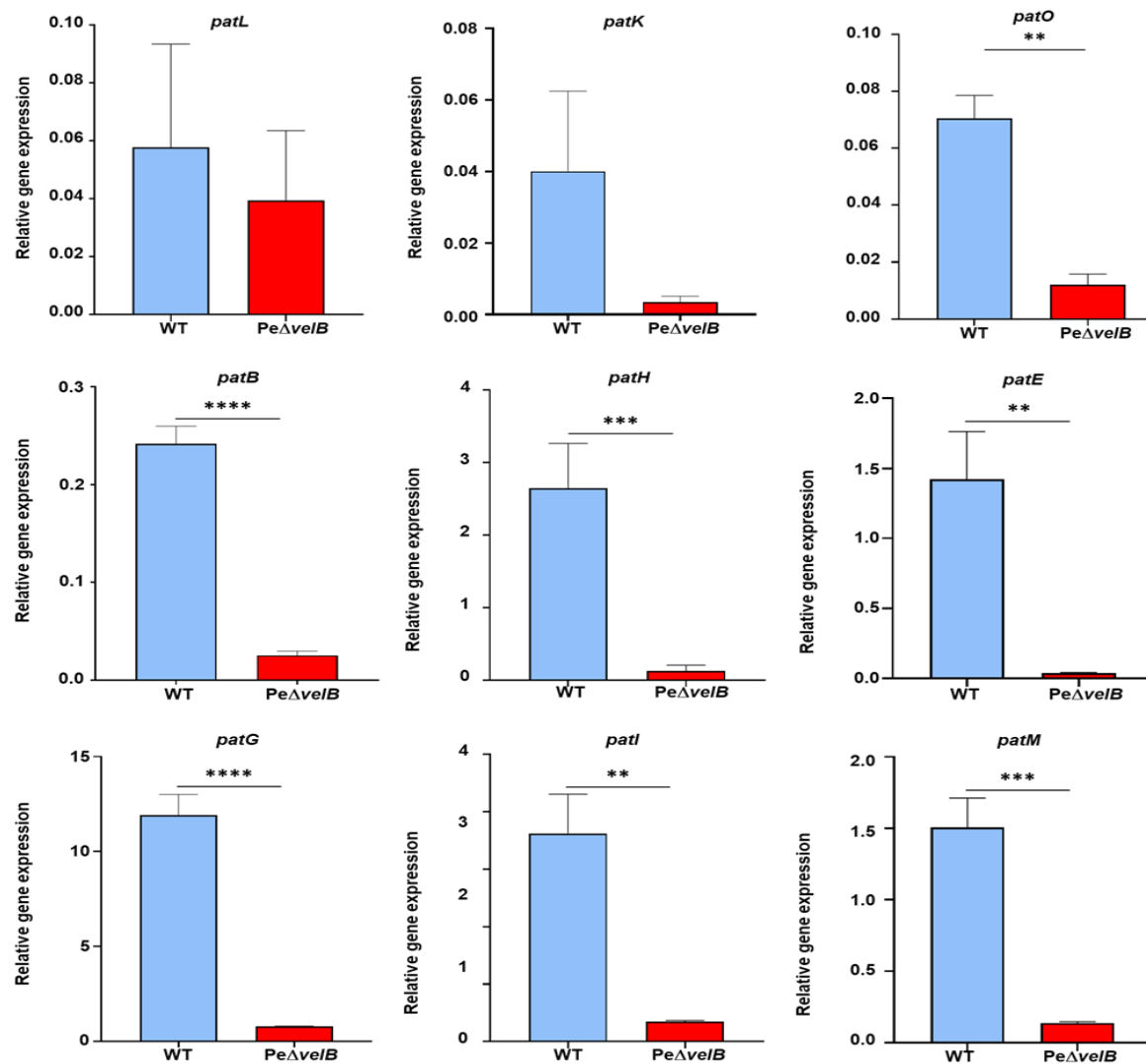
SUPPLEMENTARY TABLE 2. Primers used to analyze the expression of genes involved in the citrinin, patulin, and chaetoglobosin clusters respectively.

Cluster	Primer	Sequence 5' → 3'
Citrinin	Pexp_005510_F	GACCACGGTCACTTCCAAAGAG
	Pexp_005510_R	AGTGGTCCCCTGCAAAGCC
	Pexp_005520_F	ATATGATCCAGAAAGAAAGTCAACGAG
	Pexp_005520_R	AACAAGAACGGAAACGTATGCATC
	Pexp_005530_F	CGCGCCTTGGCTAAATCC
	Pexp_005530_R	ACGCAAAGCGCCAAGATG
	Pexp_005540_F	AAATCATCCTTCTATTTACCGGCTG
	Pexp_005540_R	CATCGTTGATTACTTTGCGTGC
	Pexp_005550_F	GTCAACGAGGGAGCATTAGTGTTAG
	Pexp_005550_R	GATGGGCATGAGAGGATGGAC
	Pexp_005560_F	GACTCCATTCCCTCAAGGTGC
	Pexp_005560_R	GTTGTATTGGTCAACAACACTTTTCGTG
	Pexp_005570_F	GTACCCCGTAGGGCTTGAG
	Pexp_005570_R	CCATGGTGGAAGTAGCAAAGGTC
	Pexp_005580_F	GACCAGATGTAAGCAGCATGGAC
	Pexp_005580_R	CACCGGCTTGAGCGAATG
	Pexp_005590_F	TGAGAGCATCCCACAGGCTG
	Pexp_005590_R	TGGCCGTTATAAGACATAAAGTTG
	Pexp_005600_F	TGCAGTGCCGATTTCTTG
	Pexp_005600_R	CACGTGCTTCGATAGCCCTG
Patulin	Pexp_PatL_F	ACTGGTGTAGGCTCAATCGTGTC
	Pexp_PatL_R	ATTTCTTAATCGTTGCATTTCTCGG
	Pexp_PatK_F	ACTCCTGGTACTGAGTACAGTGAATATGAA
	Pexp_PatK_R	CTCTGGAATCTCACCCACTGC
	Pexp_PatO_F	GGGCACGCTTCAATACGTCTA
	Pexp_PatO_R	GAAGAGGAGGATGCATCGTGG
	Pexp_PatH_F	TGGAAAACCACCACACCAAAA
	Pexp_PatH_R	CTGTGCGGATTCCAAATACGA
	Pexp_PatG_F	ATGGCGAAAATCGATGTGC
	Pexp_PatG_R	CGCGGTCCAGGGCTT
	Pexp_PatI_F	GGAAGTTCAGGCCAAAGCA
	Pexp_PatI_R	TTATGGCCGATAATGGAGTCG
	Pexp_PatB_F	GGCTATCAGCCGGCATCAAG
	Pexp_PatB_R	TGGTAATAGCGACCAGTCGAGTT
	Pexp_PatE_F	GGCACGATCTCGACGATT
	Pexp_PatE_R	GATCGTAGGCGCCCGCT

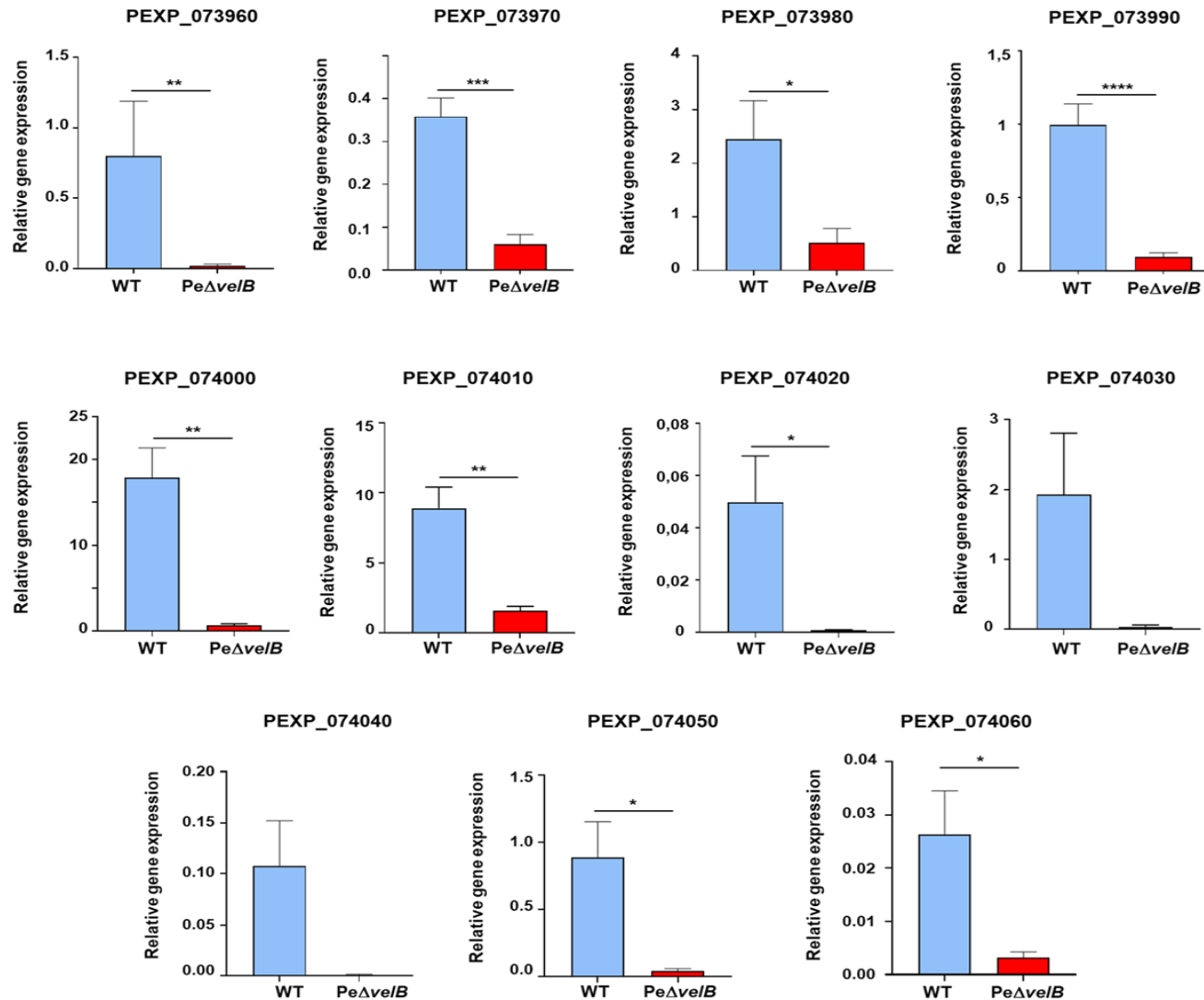
	Pexp_PatM_F	ACGCGGCCCTATTTGTTTTC
	Pexp_PatM_R	GCATCTCCATCCCGATTCCA
Chaetoglobosin	PEXP_073960_F2	TCCATTCTCTTAGTCTAGTGAC
	PEXP_073960_R2	TTCAGATGCTGGTTAGGG
	PEXP_073970_F1	GGTGATTGTGCTGGTATTG
	PEXP_073970_R1	GAGGTAGAAGTGGGTTTCAT
	PEXP_073980_F1	GAACAACCAGCCATTGAG
	PEXP_073980_R1	GTTAGGATCGCGGTAGAA
	PEXP_073990_F	GAGACGGTTCTCGTCTTTGG
	PEXP_073990_R	ACACGATGGCCGAGAAG
	PEXP_074000_F	CCAACGTTGCTATCCA
	PEXP_074000_R	TGCGGACCTTGGTAATG
	PEXP_074010_F2	GCCACAAACGACATTGA
	PEXP_074010_R2	CGGAACAACACCAAGAG
	PEXP_074020_F1	GGAAGCCGATCAGGATAA
	PEXP_074020_R1	GCTGGTCAGGACTAGTTG
	PEXP_074030_F	TGAAGTCCTCGAACCAA
	PEXP_074030_R	TTTGCTTGTTGAGGATGG
	PEXP_074040_F1	TCCTGTCGCCTCATTAT
	PEXP_074040_R1	CACCGCTGTTCTTGATAG
	PEXP_074050_F1	CACTGACGAACCAGAAAAG
	PEXP_074050_R1	GTTGCACAGAGCGATAG
	PEXP_074060_F2	TAGAGTTGGGTCGTGGT
	PEXP_074060_R2	CTCTCTCACTGTACATCTTGG



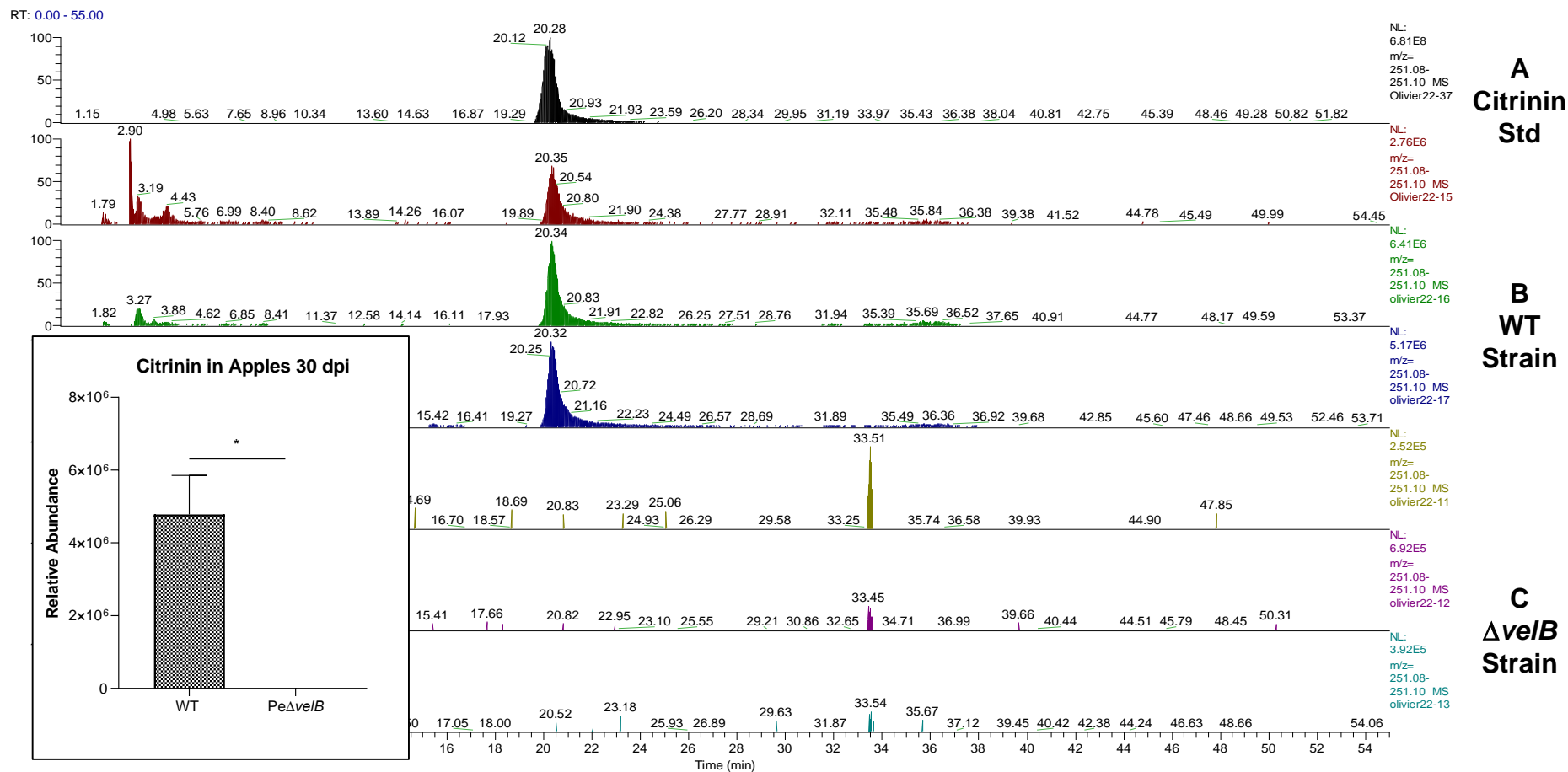
SUPPLEMENTARY FIGURE 5. Relative gene expression of the citrinin biosynthetic gene cluster (PEXP_005510-PEXP_005600) in *Penicillium expansum* wild type NRRL 35695 and the null mutant *PeΔvelB* strains by RT-qPCR. The graphs show the mean \pm standard error of the mean (SEM) from nine biological replicates and the significant differences between the wild type and the null mutant *PeΔvelB* strains. p -value ** < 0.01; *** < 0.001; **** < 0.0001.



SUPPLEMENTARY FIGURE 6. Relative gene expression of the nine genes (*patB*, *patE*, *patG*, *patH*, *patI*, *patL*, *patK*, *patM*, and *patO*) of the patulin biosynthetic gene cluster in *Penicillium expansum* wild type NRRL 35695 and the null mutant *PeΔvelB* strains by RT-qPCR. The graphs show the mean \pm standard error of the mean (SEM) from four biological replicates and the significant differences between the wild type and the null mutant *PeΔvelB* strains. *p*-value ** < 0.01; *** < 0.001; **** < 0.0001.

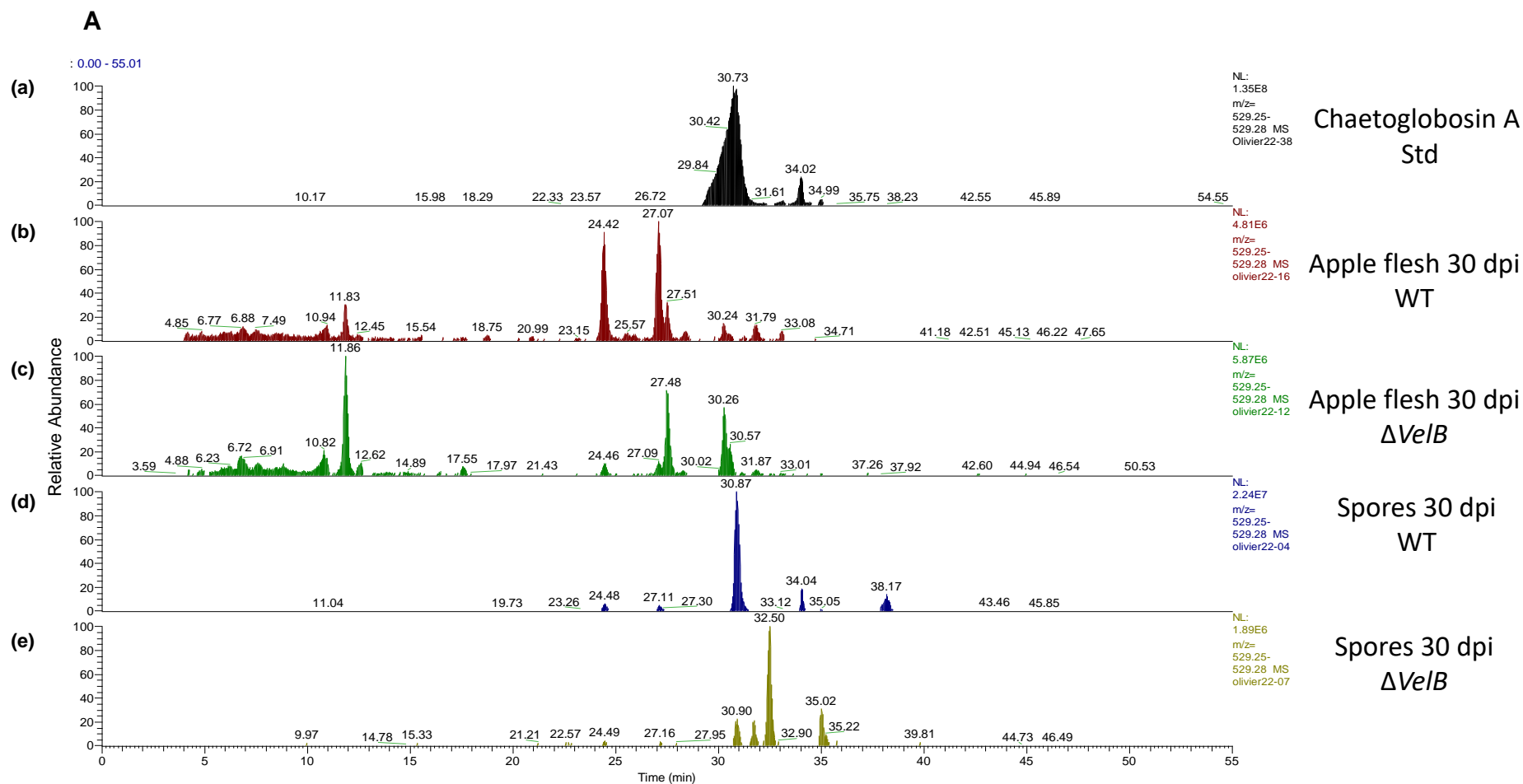


SUPPLEMENTARY FIGURE 7. Relative gene expression of the chaetoglobosin biosynthetic gene cluster (PEXP_073960-PEXP_074060) in *Penicillium expansum* wild type NRRL 35695 and the null mutant *PeΔvelB* strains by RT-qPCR. The graphs show the mean \pm standard error of the mean (SEM) from four biological replicates and the significant differences between the wild type and the null mutant *PeΔvelB* strains. p -value < 0.05 ; $** < 0.01$; $*** < 0.001$; $**** < 0.0001$.

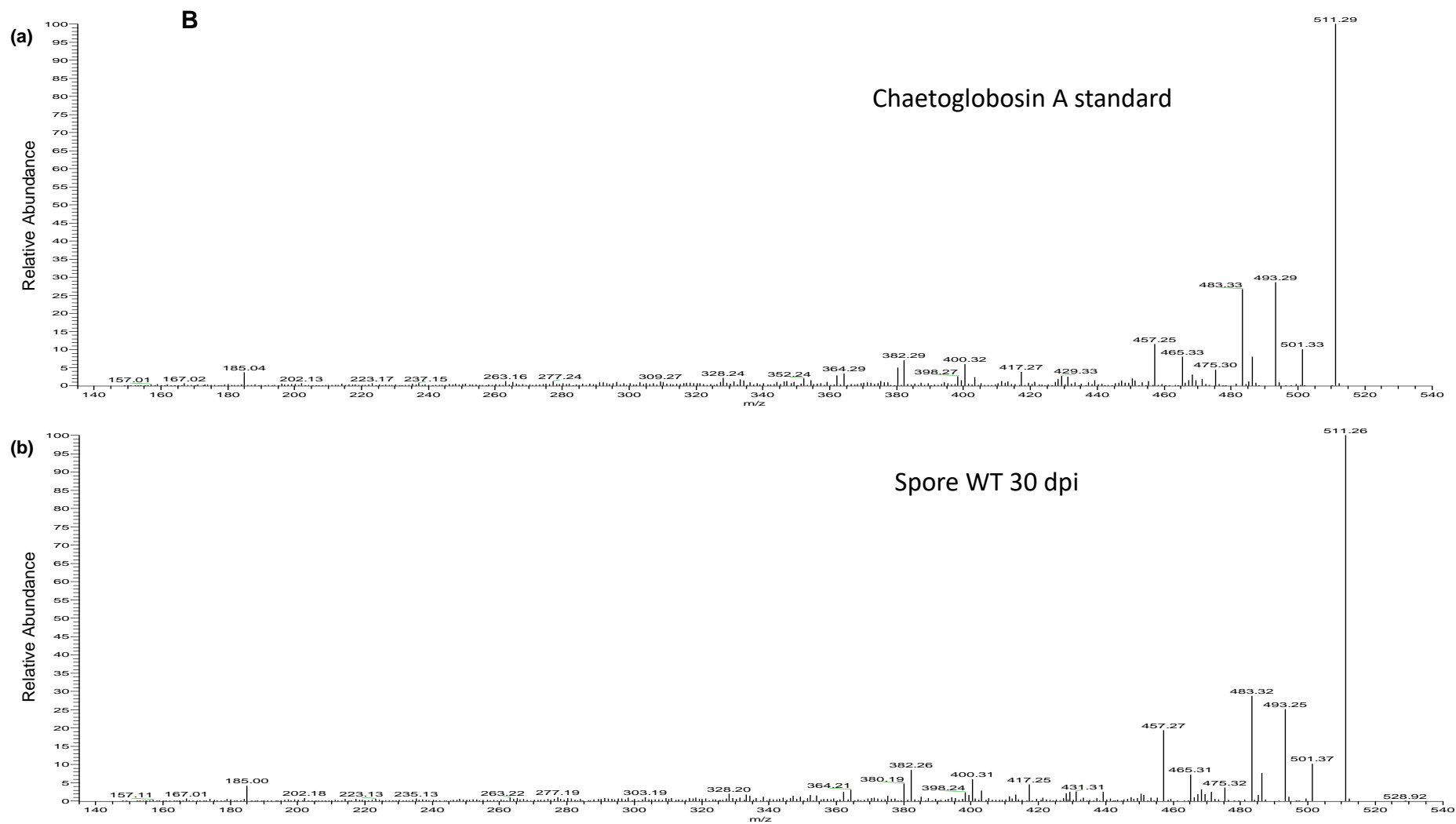


Apple 30 dpi

SUPPLEMENTARY FIGURE 8. Chromatogram showing the relative quantification by LC-MS of citrinin extracted from 30 dpi apples infected with the WT and Pe $\Delta veIB$ strains. A) Citrinin standard provided by Merck (Saint Quentin Fallavier, France). B) 30 dpi apples infected with the WT strain. C) 30 dpi apples infected with the null mutant Pe $\Delta veIB$ strain.



SUPPLEMENTARY FIGURE 9. A) Chromatograms showing the relative quantification by LC-MS of chaetoglobosin A extracted from 30 dpi apples infected with the WT and $Pe\Delta veIB$ strains. (a) Chaetoglobosin A standard provided by Merck (Saint Quentin Fallavier, France). (b) Chaetoglobosin relatives in apple flesh from 30 dpi apples infected with the WT strain. (c) Chaetoglobosin relatives in apple flesh from 30 dpi apples infected with the $Pe\Delta veIB$ strain. (d) Chaetoglobosin A in conidia extracted from 30 dpi apples infected with the WT strain. (e) Chaetoglobosin A in conidia extracted from 30 dpi apples infected with the null mutant $Pe\Delta veIB$ strain.



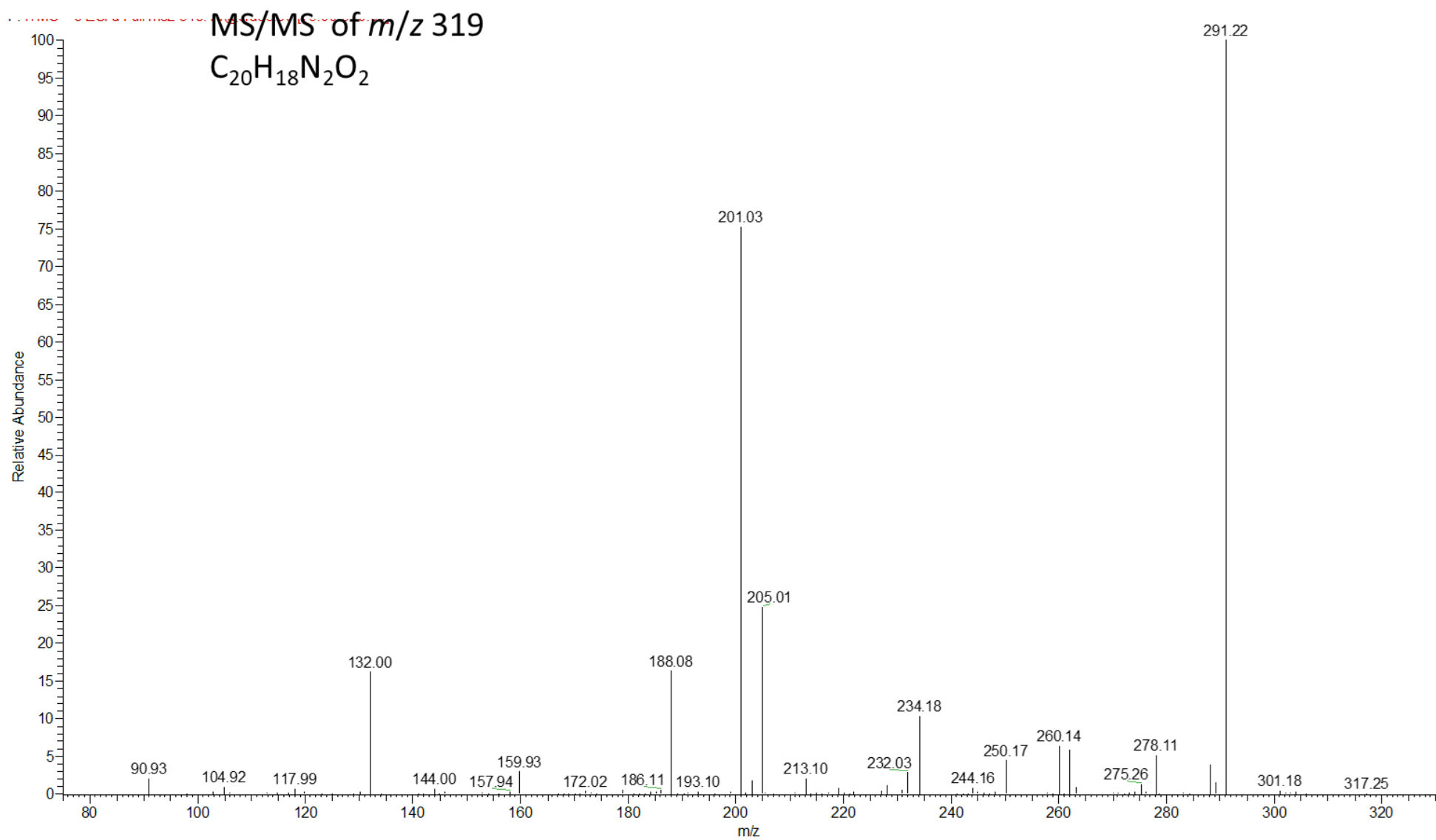
SUPPLEMENTARY FIGURE 9. B MS/MS spectrum of chaetoglobosin A. (a) Chaetoglobosin A standard. (b) Chaetoglobosin A in conidia extracted from 30 dpi apples infected with the WT strain.

A SUPPLEMENTARY TABLE 3. Secondary metabolites detected in ‘Golden Delicious’ apples infected with the null mutant *PeΔvelB* strain. A) Spores thirty days post-inoculation (dpi). B) Apple flesh 30 dpi.

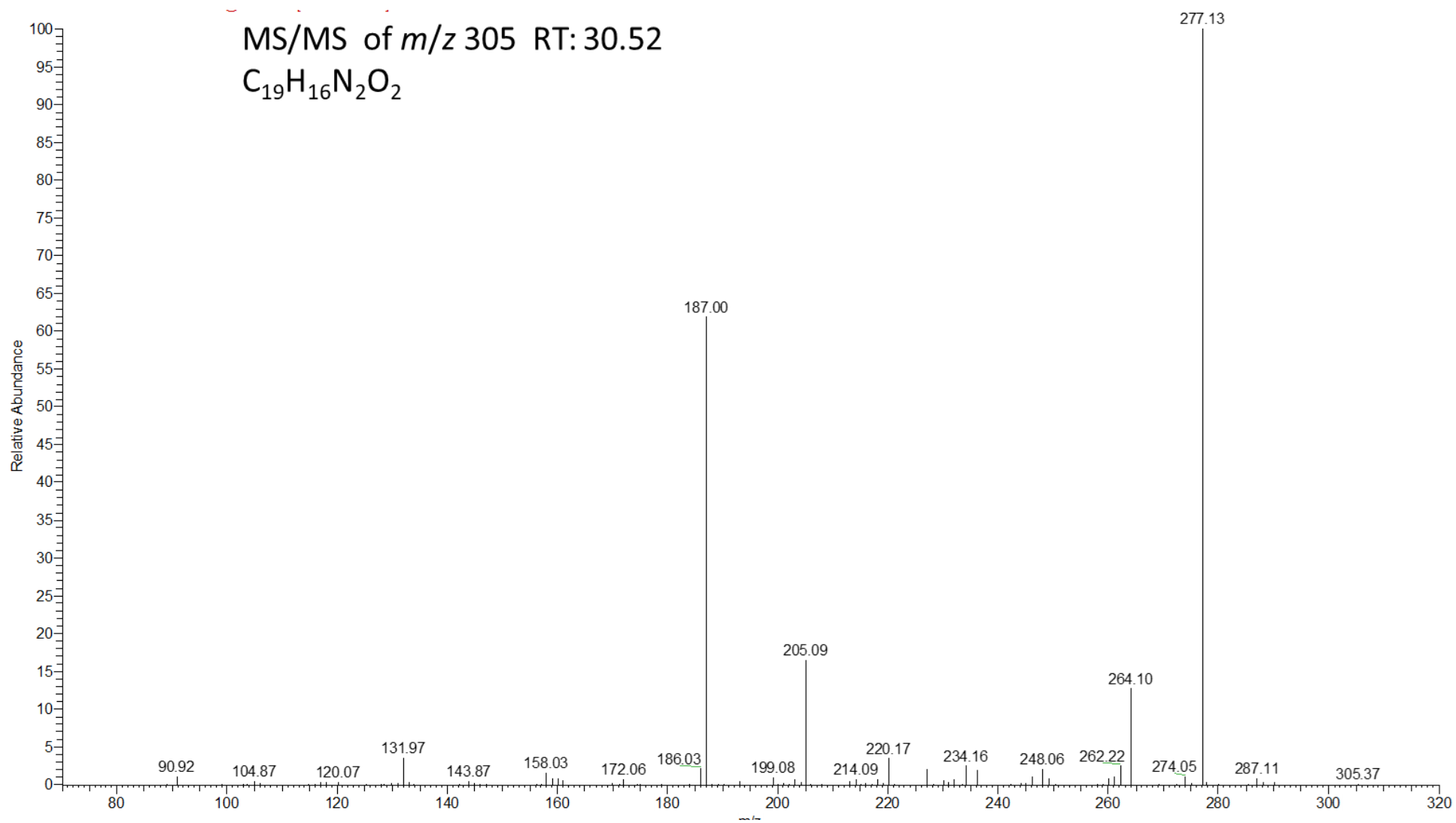
				Spores (30 dpi)							
	Measured mass	Error (ppm)	RT (min)	WT strain				<i>ΔvelB</i> strain			
				WT1	WT2	WT3	Average	<i>ΔvelB1</i>	<i>ΔvelB2</i>	<i>ΔvelB3</i>	Average
<i>m/z</i> 305 (C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₂)	305.12899	1.756	30.52	1.65E+08	8.39E+07	1.01E+08	1.17E+08	3.21E+05	6.72E+04	2.35E+05	2.08E+05
<i>m/z</i> 305 (C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₂)	305.1288	1.133	29.91	9.01E+07	3.82E+07	5.36E+07	6.06E+07	1.48E+05	ND	1.03E+05	1.26E+05
<i>m/z</i> 319 (C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₂)	319.14467	1.772	33.77	2.75E+08	1.49E+08	1.96E+08	2.07E+08	2.07E+05	ND	2.27E+05	2.17E+05
<i>m/z</i> 295 (C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₂)	295.14438	0.934	12.77	1.39E+08	5.82E+07	8.98E+07	9.57E+07	2.61E+06	5.89E+05	1.77E+07	6.97E+06
<i>m/z</i> 293 (C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₂)	293.1286	0.497	15.64	3.10E+07	9.11E+06	1.49E+07	1.83E+07	2.87E+05	7.08E+04	1.24E+06	5.33E+05
<i>m/z</i> 293 (C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₂)	293.12852	0.224	11.66	8.39E+06	2.35E+06	3.81E+06	4.85E+06	ND	ND	4.90E+05	4.90E+05
<i>m/z</i> 291 (C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₂)	291.11268	-0.427	13.28	5.80E+06	1.36E+06	2.66E+06	3.27E+06	ND	ND	ND	ND
<i>m/z</i> 291 (C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₂)	291.11285	0.157	23.81	2.84E+07	8.64E+06	1.86E+07	1.85E+07	9.75E+05	1.27E+05	7.38E+05	6.13E+05
<i>m/z</i> 291 (C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₂)	291.11323	1.462	25.53	2.14E+07	1.49E+07	2.12E+07	1.92E+07	1.03E+06	2.08E+05	8.43E+05	6.94E+05

B

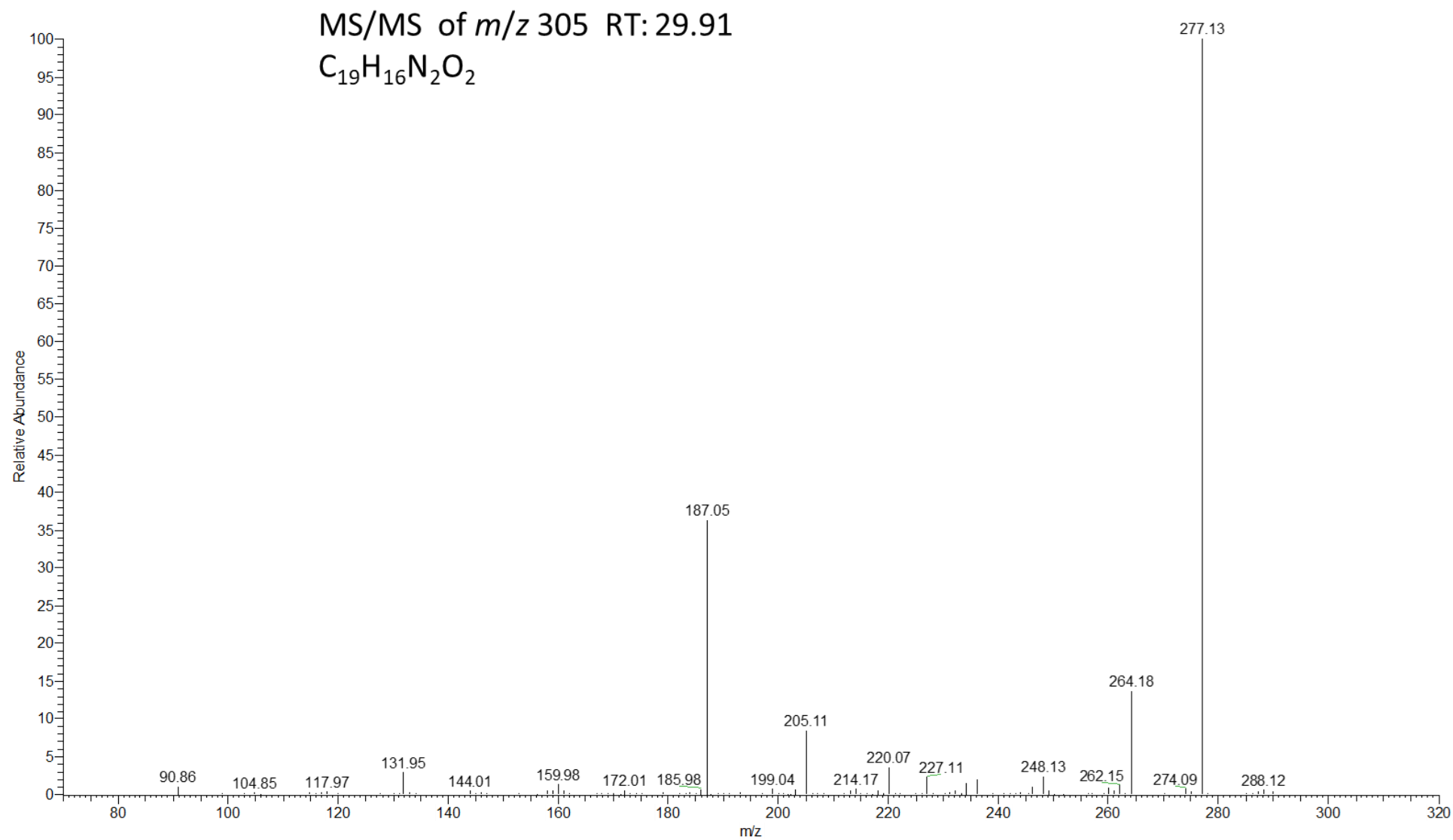
Apple flesh (30 dpi)											
	Measured mass	Error (ppm)	RT (min)	WT strain				$\Delta velB$ strain			
				WT1	WT2	WT3	Average	$\Delta velB1$	$\Delta velB2$	$\Delta velB3$	Average
<i>m/z</i> 305 (C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₂)	305.12899	1.756	30.52	1.43E+06	2.13E+06	1.72E+06	1.76E+06	ND	ND	ND	ND
<i>m/z</i> 305 (C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₂)	305.1288	1.133	29.91	5.58E+05	6.98E+05	4.93E+05	5.83E+05	ND	ND	ND	ND
<i>m/z</i> 319 (C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₂)	319.14467	1.772	33.77	9.90E+06	1.02E+07	5.87E+06	8.66E+06	ND	ND	ND	ND
<i>m/z</i> 295 (C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₂)	295.14438	0.934	12.77	2.02E+07	2.38E+07	1.57E+07	1.99E+07	8.31E+05	1.43E+06	6.56E+05	9.72E+05
<i>m/z</i> 293 (C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₂)	293.1286	0.497	15.64	8.42E+05	9.62E+05	2.88E+05	6.97E+05	ND	ND	ND	ND
<i>m/z</i> 293 (C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₂)	293.12852	0.224	11.66	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>m/z</i> 291 (C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₂)	291.11268	-0.427	13.28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>m/z</i> 291 (C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₂)	291.11285	0.157	23.81	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>m/z</i> 291 (C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₂)	291.11323	1.462	25.53	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND



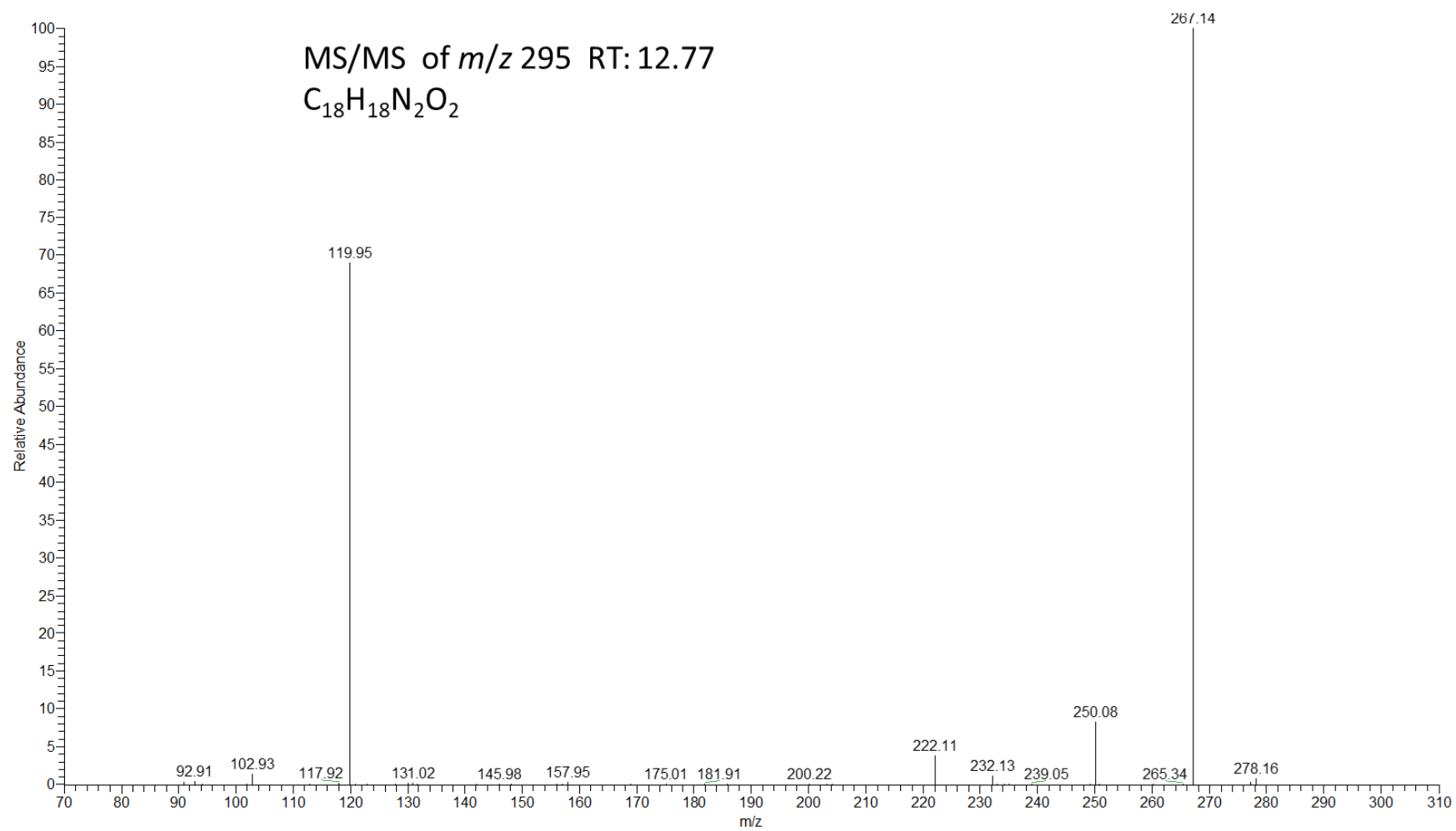
SUPPLEMENTARY FIGURE 10. A) MS/MS spectra of unknown secondary metabolite m/z 319.



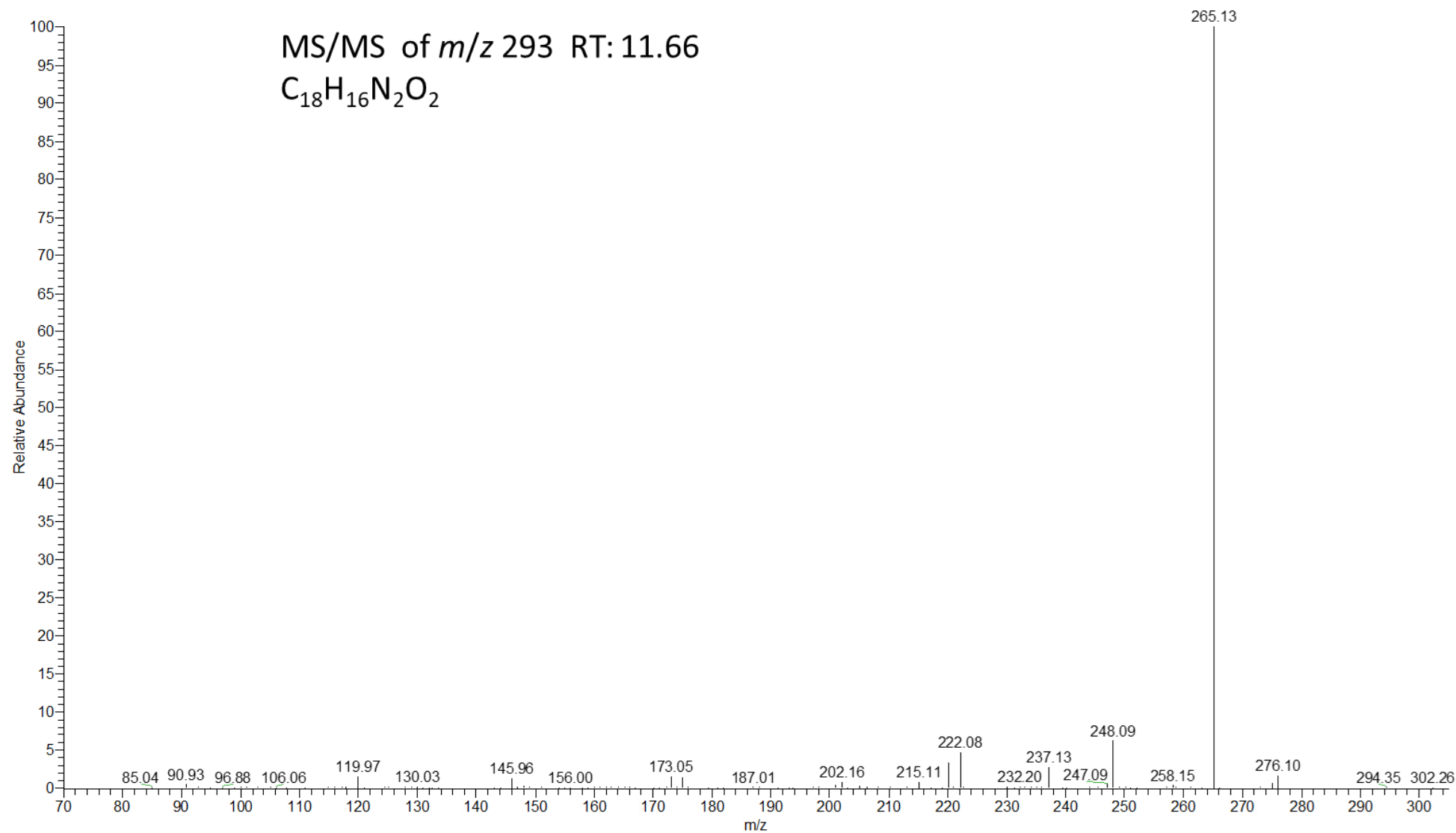
SUPPLEMENTARY FIGURE 10. B) MS/MS spectra of unknown secondary metabolite m/z 305 RT: 30.52.



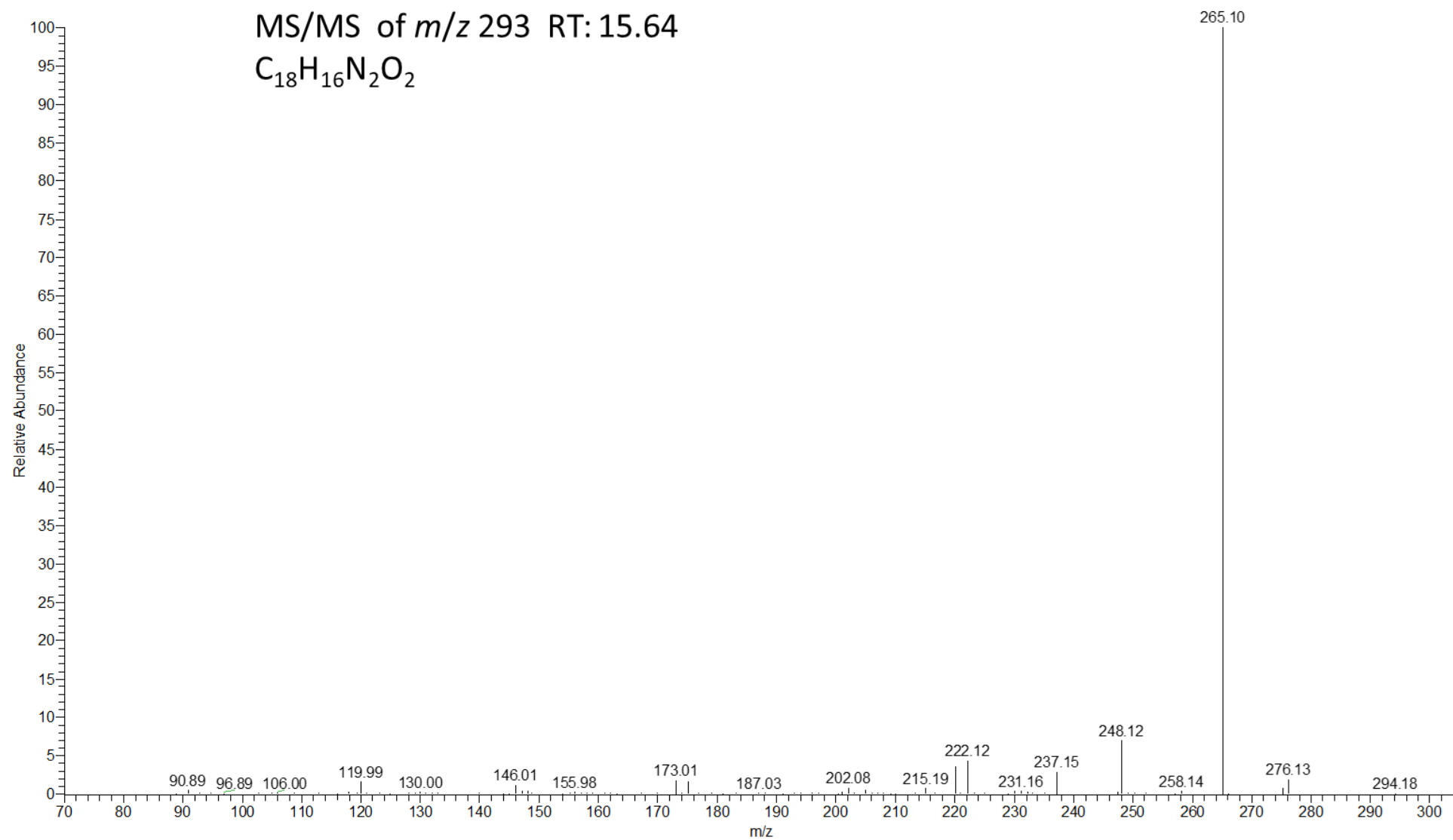
SUPPLEMENTARY FIGURE 10. C) MS/MS spectra of unknown secondary metabolite m/z 305 RT: 29.91.



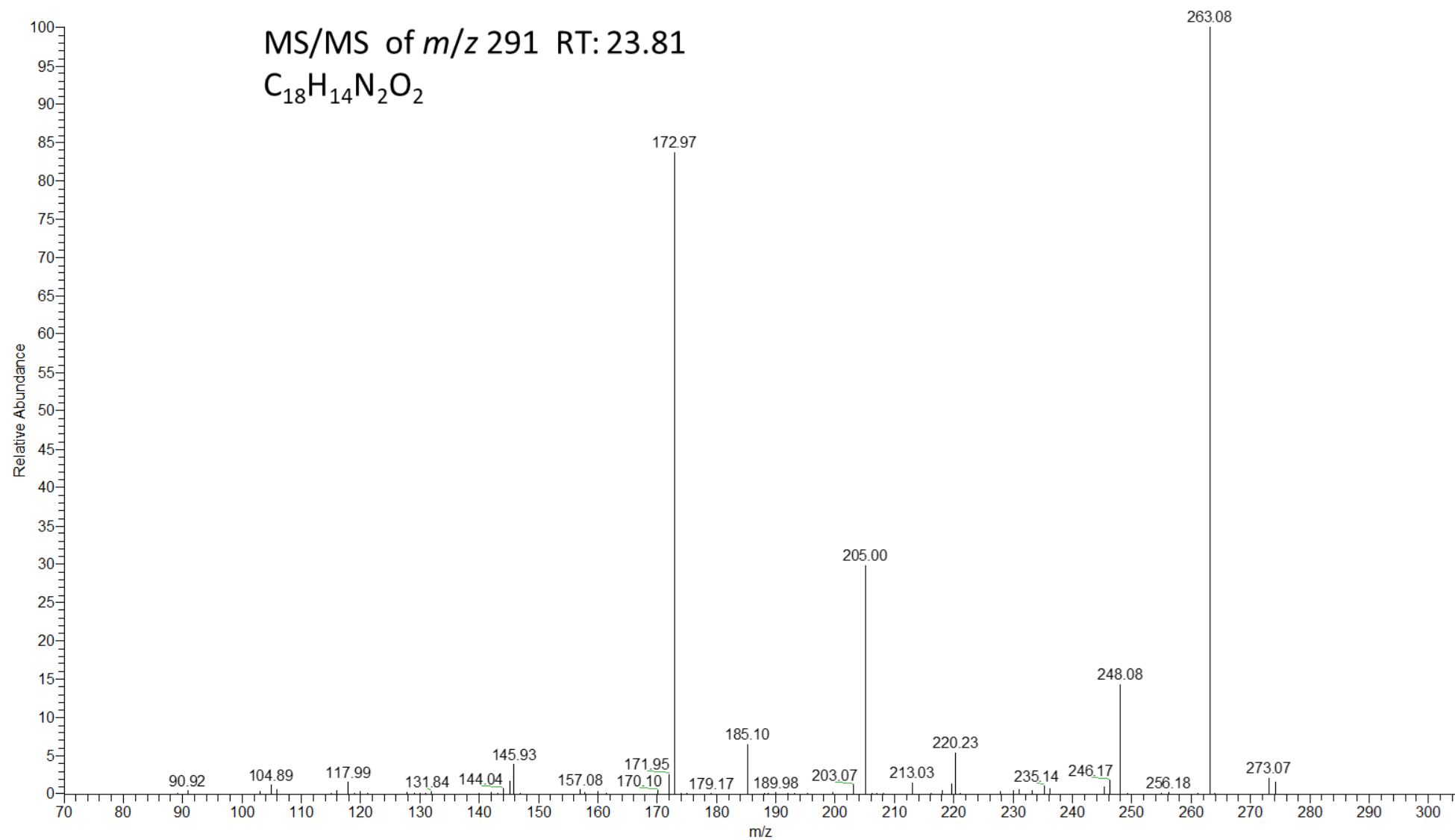
SUPPLEMENTARY FIGURE 10. D) MS/MS spectra of unknown secondary metabolite m/z 295 RT: 12.77.



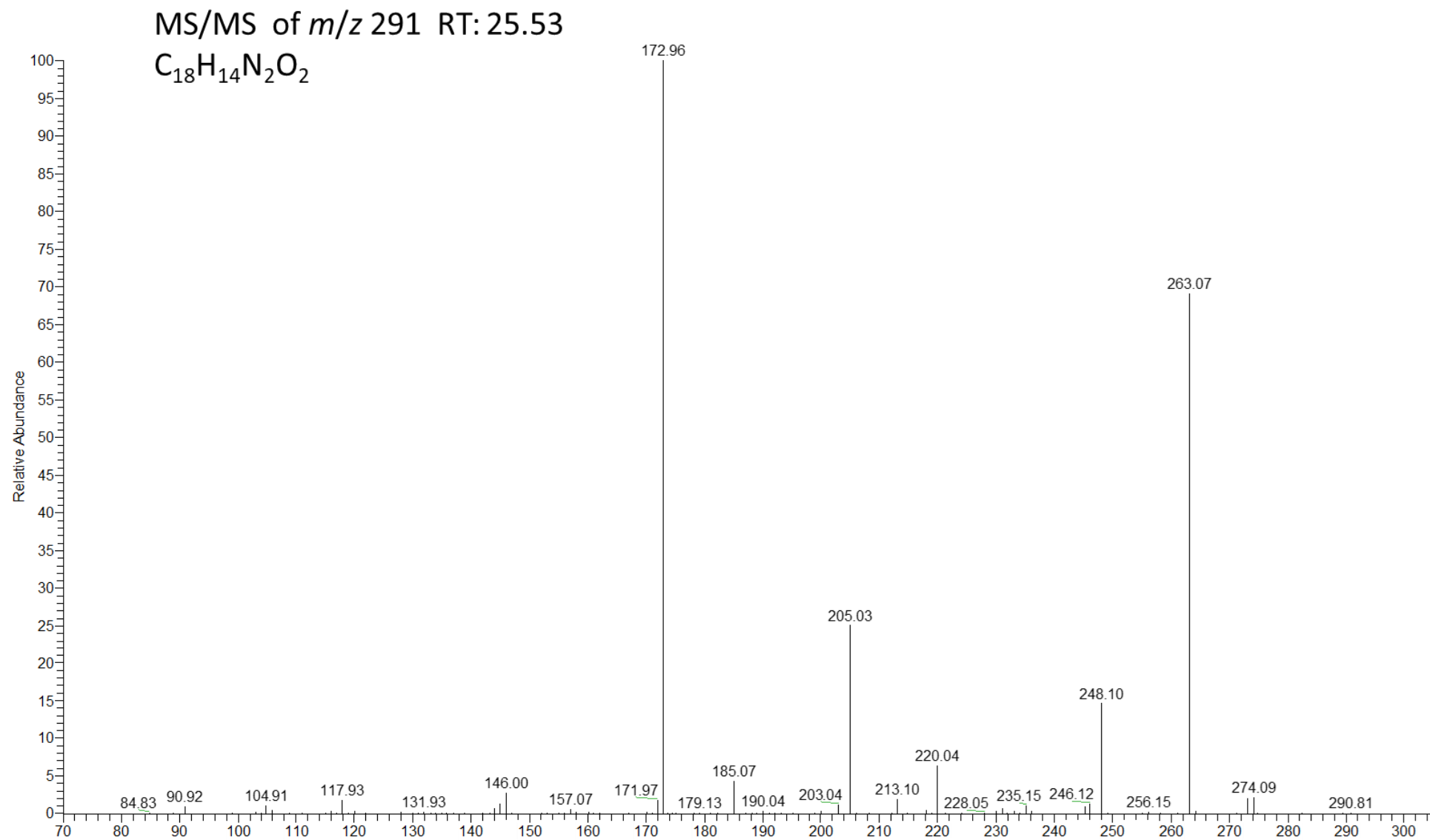
SUPPLEMENTARY FIGURE 10. E) MS/MS spectra of unknown secondary metabolite m/z 293 RT: 11.66.



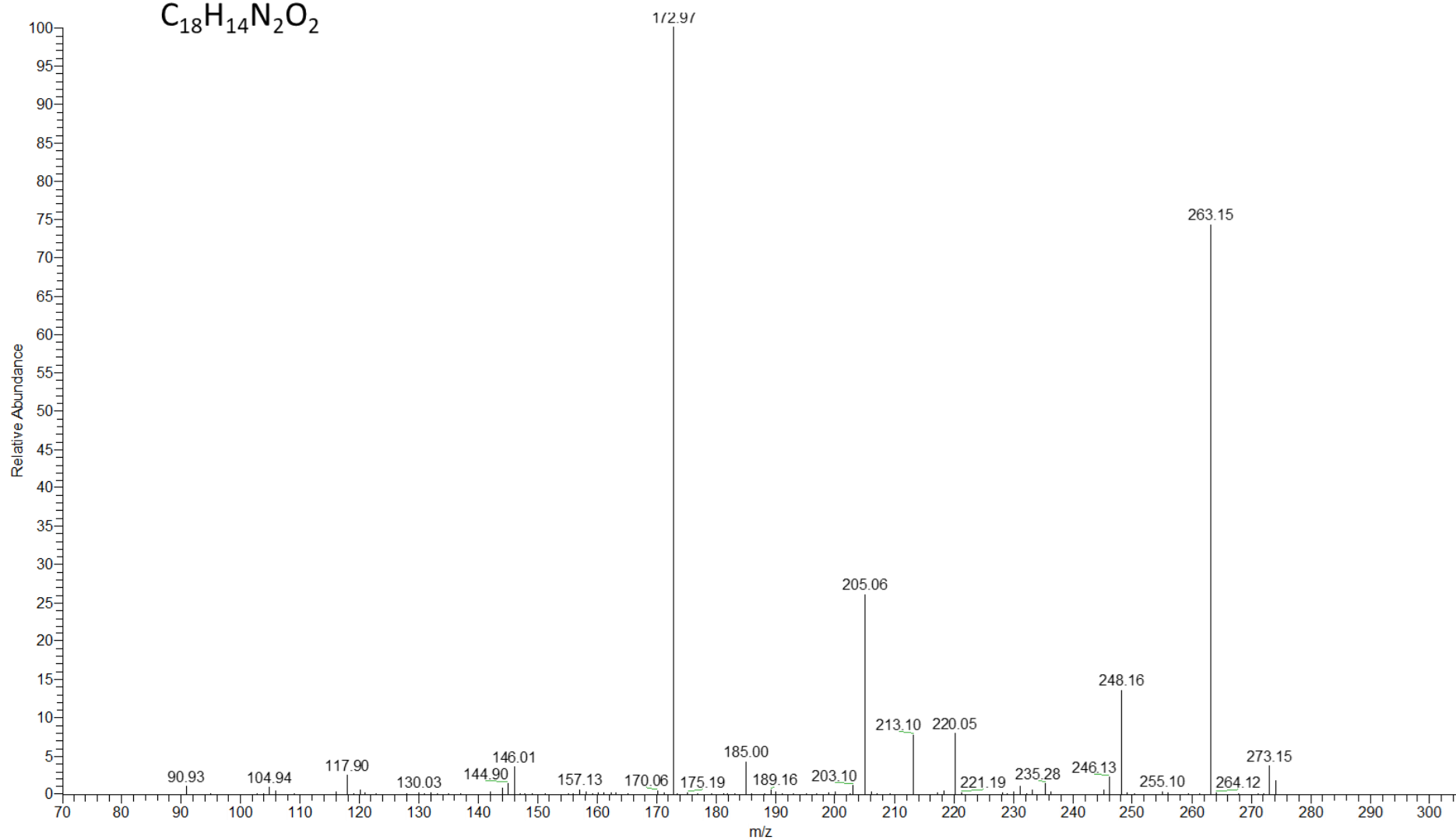
SUPPLEMENTARY FIGURE 10. F) MS/MS spectra of unknown secondary metabolite m/z 293 RT: 15.64.

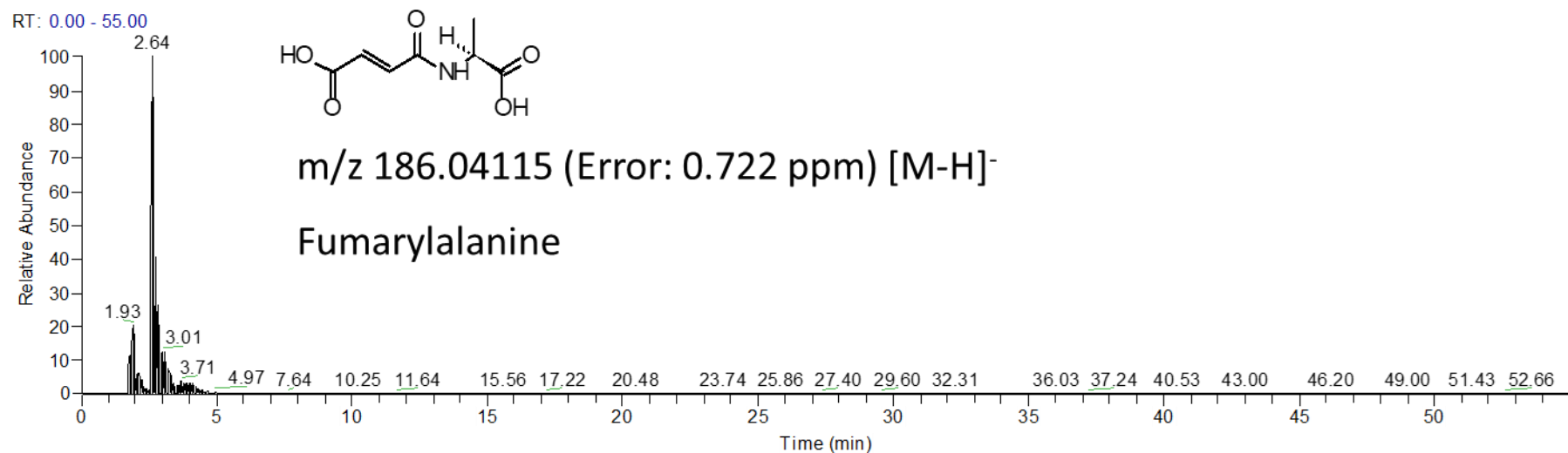


SUPPLEMENTARY FIGURE 10. G) MS/MS spectra of unknown secondary metabolite m/z 291 RT: 23.81.

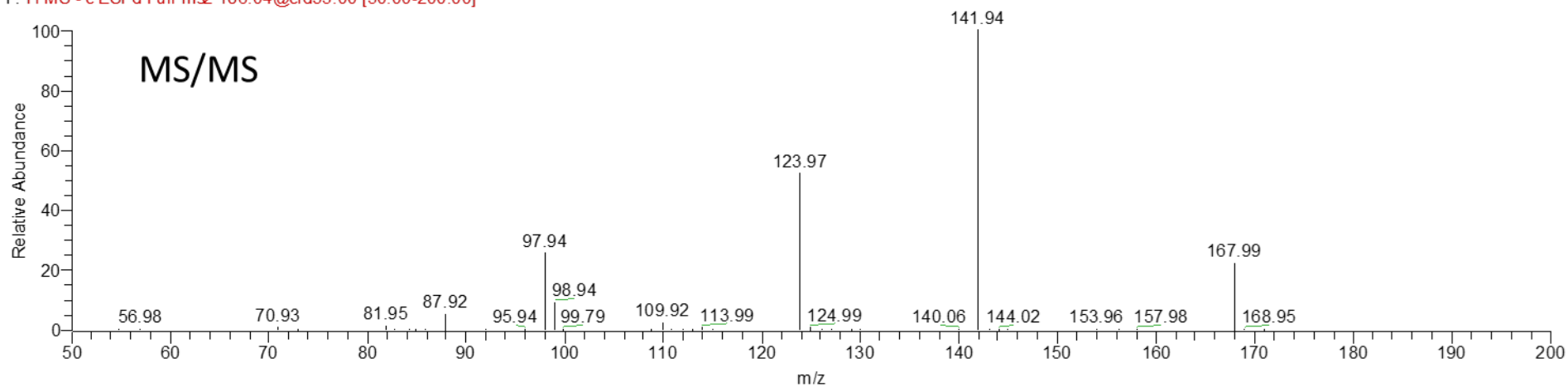


SUPPLEMENTARY FIGURE 10. H) MS/MS spectra of unknown secondary metabolite m/z 291 RT: 25.53.

MS/MS of m/z 291 RT: 13.28 $C_{18}H_{14}N_2O_2$ SUPPLEMENTARY FIGURE 10. I) MS/MS spectra of unknown secondary metabolite m/z 291 RT: 13.28.



Olivier22-29 #317-420 RT: 2.68-2.71 AV: 3 NL: 1.52E4
F: ITMS - c ESI d Full ms2 186.04@cid35.00 [50.00-200.00]



SUPPLEMENTARY FIGURE 11. MS/MS spectra of fumarylalanine detected in the null mutant *PeΔvelB* strain.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
Presticulosum	TGGTAAGTGCCGAGCTTTTTTTCGCGTTGGGTATCAATTGACAAATTTACTAACTGGATTGCAGGCCAAACCATCTCTGGC								
PeCBS325.48	TGGTAAGTGCCGAGCTTTTTTTCGCGTTGGGTATCAATTGACAAATTTACTAACTGGATTGCAGGCCAAACCATCTCTGGC								
Pestraind1	TGGTAAGTGCCGAGCTTTTTTTCGCGTTGGGTATCAATTGACAAATTTACTAACTGGATTGCAGGCCAAACCATCTCTGGC								
Consensus	TGGTAAGTGCCGAGCTTTTTTTCGCGTTGGGTATCAATTGACAAATTTACTAACTGGATTGCAGGCCAAACCATCTCTGGC								
	81	90	100	110	120	130	140	150	160
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
Presticulosum	GAGCACGGTCTCGATGGTGTGGACAGTARGTTCAACGGTGTGGGTTTCTAGTAGATCACACGTCTGATATCTTGCTAG								
PeCBS325.48	GAGCACGGTCTCGATGGTGTGGACAGTARGTTCAACGGTGTGGGTTTCTAGTAGATCACACGTCTGATATCTTGCTAG								
Pestraind1	GAGCACGGTCTCGATGGTGTGGACAGTARGTTCAACGGTGTGGGTTTCTAGTAGATCACACGTCTGATATCTTGCTAG								
Consensus	GAGCACGGTCTCGATGGTGTGGACAGTARGTTCAACGGTGTGGGTTTCTAGTAGATCACACGTCTGATATCTTGCTAG								
	161	170	180	190	200	210	220	230	240
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
Presticulosum	GTACAATGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGACCGTCTACTTCAACCATGTGAGTACACCGACTGTTTACCGAA								
PeCBS325.48	GTACAATGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGACCGTCTACTTCAACCATGTGAGTACACCGACTGTTTACCGAA								
Pestraind1	GTACAATGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGACCGTCTACTTCAACCATGTGAGTACACCGACTGTTTACCGAA								
Consensus	GTACAATGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGACCGTCTACTTCAACCATGTGAGTACACCGACTGTTTACCGAA								
	241	250	260	270	280	290	300	310	320
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
Presticulosum	TAATCGTGCATCATCTGATCGGATCTTTTCTTTGATAATCTAGGCCAGCGGTGACAAAGTACGTTCCCGTGCCTTCTC								
PeCBS325.48	TAATCGTGCATCATCTGATCGGATCTTTTCTTTGATAATCTAGGCCAGCGGTGACAAAGTACGTTCCCGTGCCTTCTC								
Pestraind1	TAATCGTGCATCATCTGATCGGATCTTTTCTTTGATAATCTAGGCCAGCGGTGACAAAGTACGTTCCCGTGCCTTCTC								
Consensus	TAATCGTGCATCATCTGATCGGATCTTTTCTTTGATAATCTAGGCCAGCGGTGACAAAGTACGTTCCCGTGCCTTCTC								
	321	330	340	350	360	370	380	390	400
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
Presticulosum	GTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGCCGTCGGTCCCTTCGGCAAGCTTTCCGCCCGACAACCTTCGTCTT								
PeCBS325.48	GTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGCCGTCGGTCCCTTCGGCAAGCTTTCCGCCCGACAACCTTCGTCTT								
Pestraind1	GTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGCCGTCGGTCCCTTCGGCAAGCTTTCCGCCCGACAACCTTCGTCTT								
Consensus	GTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGCCGTCGGTCCCTTCGGCAAGCTTTCCGCCCGACAACCTTCGTCTT								
	401	410	420	428					
	-----+-----+-----+-----								
Presticulosum	CGGTCAGTCCGGTGTGGTAACTGG								
PeCBS325.48	CGGTCAGTCCGGTGTGGTAACTGG								
Pestraind1	CGGTCAGTCCGGTGTGGTAACTGG								
Consensus	CGGTCAGTCCGGTGTGGTAACTGG								

SUPPLEMENTARY FIGURE 12. Alignment of partial sequences of β -tubulin gene from *Penicillium resticulosum* CBS 609.94, *Penicillium expansum* CBS325.48 (neotype), *P. expansum* strain d1 (reference genome). The strain CBS 609.94 is the strain P47 initially used in the Birkinshaw, Restrick and Smith's study describing the isolation of the fumarylalanine. The β -tubulin fragment was amplified with the primers btub2a and btub2b according to Glass and Donaldson (1995).

REFERENCES OF SUPPORTING INFORMATION

- Birkinshaw, J.H., Raistrick, H. & Smith, G. (1942) Studies in the biochemistry of micro-organisms: Fumaryl-dl-alanine (fumaromono-dl-alanide), a metabolic product of *Penicillium resticulosum* sp.nov. *Biochemical Journal*, 36, 829-35. doi: 10.1042/bj0360829
- Caceres, I., El Khoury, R., Medina, Á., Lippi, Y., Naylies, C., Atoui, A. et al.. (2016) Deciphering the Anti-Aflatoxinogenic Properties of Eugenol Using a Large-Scale q-PCR Approach. *Toxins* 8, E123. doi: 10.3390/toxins8050123
- Glass, N.L. & Donaldson, G.C. (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied. Environmental. Microbiology*, 61, 1323–1330. doi: 10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Moore, G.G., Mack, B.M., Beltz, S.B. & Puel, O. (2018) Genome sequence of an aflatoxigenic pathogen of Argentinian peanut, *Aspergillus arachidicola*. *BMC Genomics* 19, 1–12. doi: 10.1186/s12864-018-4576-2
- Snini, S.P., Tannous, J., Heuillard, P., Bailly, S., Lippi, Y., Zehraoui, E. et al. (2016) Patulin is a cultivar-dependent aggressiveness factor favouring the colonization of apples by *Penicillium expansum*. *Molecular Plant Pathology* 17, 920–930. doi: 10.1111/mpp.12338
- Tannous, J., El Khoury, R., Snini, S.P., Lippi, Y., El Khoury, A., Atoui, A. et al. (2014) Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology* 189, 51–60. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.028
- Zetina-Serrano, C., Rocher, O., Naylies, C., Lippi, Y., Oswald, I.P., Lorber, S. et al. (2020) The brlA Gene Deletion Reveals That Patulin Biosynthesis Is Not Related to Conidiation in *Penicillium expansum*. *International Journal of Molecular Sciences* 21, E6660. doi: 10.3390/ijms21186660

Chapitre 2

Implication de LaeA dans le développement, la pathogénicité et le métabolisme secondaire chez *Penicillium expansum*



RÉSUMÉ DE L'ÉTUDE

Penicillium expansum est un champignon filamenteux ubiquitaire qui infecte principalement les pommes et leurs produits dérivés. Il est la cause principale de la maladie de pourriture bleue et le principal producteur de patuline. Par contre, cette dernière n'est pas la seule mycotoxine produite par ce champignon toxique. Ce dernier est capable de produire une grande variété de métabolites secondaires. Chez les champignons filamenteux, la régulation du métabolisme secondaire peut être spécifique et/ou globale. La régulation spécifique se fait par le biais de facteurs de transcription (FT) dits spécifiques, codés par des gènes localisés généralement à l'intérieur du cluster biosynthétique des gènes impliqués dans la biosynthèse des métabolites secondaires. Ces FT spécifiques, sont eux-mêmes régulés par des FT globaux, codés par des gènes localisés à l'extérieur des clusters biosynthétiques et contrôlés par des facteurs biotiques ou abiotiques. LaeA est un FT global impliqué dans la régulation de nombreux processus physiologiques chez diverses espèces de champignons filamenteux. C'est une méthyltransférase et l'une des composantes d'un complexe protéique appelé le complexe velvet, dont la formation est inhibée par la lumière.

Bien que le rôle de LaeA dans la régulation du développement, de la reproduction sexuée et asexuée, de la virulence et du métabolisme secondaire ait été démontré chez différentes espèces de champignons filamenteux, on s'est intéressé dans cette partie à son implication encore peu étudiée dans la régulation de ces processus chez *P. expansum*.

Ce deuxième chapitre constitue une continuité du premier chapitre de ce manuscrit, où nous avons investigué les rôles de *velB*, un autre membre du complexe velvet. De la même manière, nous avons cherché dans cette deuxième partie à déterminer les rôles de LaeA chez *P. expansum*, par un ensemble d'études réalisées *in vitro* et *in planta*. Dans cet objectif, une souche mutante *PeΔlaeA* ainsi qu'une souche complémentée *PeΔlaeA:laeA* ont été générées à partir de la souche sauvage (WT) de *P. expansum*. Dans un premier lieu, l'effet de LaeA sur la croissance

du champignon et son développement a été analysé sur des milieux synthétiques. Dans un deuxième lieu, l'implication de ce FT global dans la pathogénicité du champignon a été évaluée en infectant des pommes de la variété Golden Delicious avec les trois souches, WT, *PeΔlaeA* et *PeΔlaeA:laeA* puis en suivant leur développement in planta. La production de patuline et de chaétoglobosine A par ces souches a également été quantifiée in vitro et in planta. Dans un troisième lieu, l'intervention de LaeA dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans le développement et le métabolisme secondaire chez *P. expansum* a été démontrée en effectuant une analyse transcriptomique par microarray.

En conclusion, les résultats obtenus dans cette étude valident l'hypothèse que LaeA est un gène maître dans la régulation du développement et du métabolisme secondaire de *P. expansum*.

LaeA, a master gene in the development, pathogenicity, and secondary metabolism of *Penicillium expansum*

Nadia Tahtah^a, Chrystian Zetina-Serrano^a, Ophélie Rocher^a, Selma P. Snini^{a,b}, Claire Naylies^a, Yannick Lippi^a, Emilien L. Jamin^a, Isabelle P. Oswald^a, Sophie Lorber^a, Olivier Puel^{a*}

^aToxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

^bPresent address, Laboratoire de Génie Chimique, Université de Toulouse, CNRS, 31326 Toulouse, France

Correspondence

Olivier Puel

UMR1331 Toxalim – INRAE / INPT / UPS - 180 Chemin de Tournefeuille - BP 93173 - 31027 Toulouse cedex 3 - France

Email: olivier.puel@inrae.fr

ABSTRACT

Penicillium expansum is one of the most studied species of filamentous fungi. It mainly infects apples and causes blue mold disease. Patulin is the main mycotoxin produced by *P. expansum* in apples and their derived-products. However, patulin is not the only mycotoxin produced by *P. expansum*, as the latter produces a wide variety of secondary metabolites. In filamentous fungi, the regulation of secondary metabolism can be specific and/or global. Global transcription factors (TFs) are controlled by environmental stimuli. Among these global TFs, the light-regulated velvet complex coordinates the development and secondary metabolism of fungi. LaeA is a key member of the velvet complex that controls several physiological processes in numerous fungal species. To determine the specific roles of this methyltransferase in the development and secondary metabolism of *P. expansum*, a null mutant $Pe\Delta laeA$ strain and a complemented $Pe\Delta laeA: laeA$ strain were generated. The $Pe\Delta laeA$ strain showed delayed development patterns compared to the wild type and complemented strains on the Golden Delicious cultivar, showing that LaeA affects the pathogenicity of *P. expansum*. Deletion of the *laeA* gene strongly inhibited the production of patulin and chaetoglobosin A both in vitro and in planta. Microarray analysis showed that all genes involved in the biosynthesis of these two mycotoxins were strongly down-regulated in the $Pe\Delta laeA$ strain. A less significant effect was found in the genes involved in citrinin biosynthesis. The expression of other genes involved in other physiological processes was also investigated. Our results showed the involvement of LaeA in the positive regulation of conidiation and more specifically of the master genes *brlA*, *wetA*, and *abaA*, as well as of the biosynthesis of pigments or hydrophobins. Conversely, LaeA negatively regulates iron uptake, nitrate assimilation, and ergosterol biosynthesis.

Keywords

Penicillium expansum, patulin, chaetoglobosin A, fumarylalanine, siderophore, ergosterol.

INTRODUCTION

After the active growth phase during primary metabolism, filamentous fungi mainly from the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Byssosclamyces* and *Claviceps* produce a large number of secondary metabolites (SM) during secondary or specialized metabolism, the transition phase of which usually coincides with nutrient depletion, pH change, development of reproductive structures or absence of light (Calvo et al., 2002; Yu and Keller, 2005). Some beneficial SM such as penicillin (antibiotic), lovastatin (anti-cholesterol agent), strobilurins (fungicide), or kojic acid (antioxidant) are used in the pharmaceutical, agricultural, agri-food or cosmetic sectors, while others, mycotoxins, have been shown to be harmful to human or animal health and some of them are regulated (EC Commission Regulation, 2006). SM confer a selective advantage for fungi producing them due to their roles in intra- and interspecies communication, protection against abiotic stresses, development, or as virulence or pathogenicity factors (Bartholomew et al., 2022; Bills and Gloer, 2016; Brakhage, 2013; Keller, 2019).

SM biosynthesis genes are most often organized in clusters located in subtelomeric regions of chromosomes (Palmer and Keller, 2010; Zhang et al., 2016) but also in central positions on chromosome arms from 30 to 700 kb of telomeres (Perrin et al., 2007; Shwab et al., 2007). SM production is subject to numerous regulations via specific transcription factors (TFs) such as PatL for the patulin cluster (Ballester et al., 2015; Li et al., 2015; Snini et al., 2016), CtnA for the citrinin cluster (Ballester et al., 2015; He and Cox, 2016), or AflR for the aflatoxin cluster (Price et al., 2006), embedded most often in clusters. Specific TFs are under the control of global factors, which are themselves influenced by environmental stimuli.

Among the global TFs, LaeA (loss of aflR expression) was found in a screen of mutants unable to produce sterigmatocystin (ST) precursors (Butchko et al., 1999; Bok and Keller, 2004). Conserved in all ascomycetes, LaeA is a non-homologous protein with no homology to other TFs that has a methyltransferase domain with several S-adenosylmethionine (SAM) binding

sites identical to those of histone and arginine methyltransferases (Bok et al., 2006). LaeA also has a nuclear localization signal near the N-terminal end and is constitutively expressed in the nucleus (Bayram and Braus, 2012). LaeA affects the expression of many SM clusters, up to 50% in *Aspergillus* sp. (Amare et al., 2014; Sarikaya-Bayram et al., 2015; Perrin et al., 2007), in a temperature-dependent manner as 11 of the 37 SM gene clusters were more expressed at 30° than at 37° in *A. fumigatus* (Lind et al., 2016). In this fungus, LaeA positively controls the biosynthesis of helvolic acid, gliotoxin, endocrocin, pseurotin, hexadecahydroastechrome, fumagillin, fumitremorgin or SidE, an NRPS involved in the biosynthesis of N-fumarylalanine, among others (Abad et al., 2010; Lim et al., 2012; Perrin et al., 2007; Steinchen et al., 2013; Vödösch et al., 2011; Wiemann et al., 2013; Yin et al., 2013). Deletion of LaeA blocks the expression of gene clusters responsible for the biosynthesis of ST which is additionally location specific (Bok et al., 2006), penicillin, terraquinone, and mycelial pigments in *A. nidulans* (Bok and Keller, 2004; Bok et al., 2013). In addition, overexpression of laeA (OE*laeA*) results in an increase in the bioactive compound diorcinol (Khan et al., 2020). LaeA also positively regulates the biosynthesis of aflatoxins (Kale et al., 2008) and ustiloxin B in *A. flavus* (Lv et al., 2018), ochratoxin A in *A. carbonarius* (Crespo et al., 2013) and *A. ochraceus* (Wang et al., 2019), echinocandin B and ST in *A. pachycristatus* (Lan et al., 2020), or penicillin G and melanin in *Magnaporthe oryzae* (Saha et al., 2020). In *A. niger*, the biosynthesis of 14 compounds including flaviolin was activated in an OE*laeA* mutant (Wang et al., 2021). In *B. cinerea*, the synthesis of oxalic acid is positively regulated by LaeA as well as that of alternariol, its monomethyl ether derivative, and melanin in *Alternaria alternata* (Takao et al., 2016), beauvericin and bassiatin in *Beauveria bassana* (Yin et al., 2022), chaetoglobosins in *Chaetomium globosum* (Cheng et al., 2018; Jiang et al., 2016), T-toxin in *Cochliobolus heterostrophus* (Wu et al., 2012), versicolor A in *A. versicolor* (He et al., 2020), lovastatin in *A. terreus* (Zhgun et al., 2019), kojic acid in *A. oryzae* (Oda et al., 2011), citrinin and six

pigments in *Monascus ruber* (Liu et al., 2016). In *Fusarium* sp. the biosynthesis of bikaverin, fumonisins, fusaric acid, and fusarins is positively regulated by LaeA (Butchko et al., 2012; Kim et al., 2013) except in *F. fujikoroii* where LaeA represses bikaverin and verticillin biosynthesis (Wiemann et al., 2010). LaeA also negatively controls the expression of certain clusters including cladofulvin in *Cladosporium fulvum* (Griffith et al., 2015).

In addition to its major role as a regulator of SM gene clusters, LaeA plays a role in important physiological processes. In many species such as *A. fumigatus*, where this phenomenon was first reported, *A. carbonarius*, *F. graminearum*, *Cochliobolus sativus*, deletion of the *laeA* gene results in decreased virulence (Bok et al., 2005; Kim et al., 2013; Maor et al., 2021; Sugui et al., 2007; Wang et al., 2016). LaeA is involved in asexual reproduction as conidia and sclerotia production is strongly decreased in *laeA* mutants (Kale et al., 2008; Kopke et al., 2013; Wiemann et al., 2010) as well as hyphal pigmentation. LaeA plays a role in Hülle cell morphogenesis (Bayram and Braus, 2012) and normal cleistothecia formation (Sarıkaya-Bayram et al., 2010). In *A. alternata*, LaeA positively regulates host-specific toxin biosynthesis, pathogenicity, growth and differentiation (Takao et al., 2016). LaeA is also involved in the proper functioning of sexual reproduction (Sarıkaya-Bayram et al., 2010) along with the other two members of the velvet complex, VeA and VelB, whose expression and post-translational modifications it controls (Sarıkaya-Bayram et al., 2015).

The interest of many works performed on *laeA* gene deletion mutants was focused on the revelation of silent or cryptic clusters, however the molecular function of LaeA remains partially misunderstood. Evidence suggests that LaeA may regulate SM clusters epigenetically through chromatin remodeling via post-translational modifications of histones, including positioning or removal of methyl and acetyl groups on lysines or arginines (Bok et al., 2009; Strauss and Reyes-Dominguez, 2011). LaeA is thought to be involved in the reversion of heterochromatic marks, in particular trimethylation of histone 3 lysine 9 (H3K9me3), located

in the *aflR* promoter of the ST cluster mediated by the HepA (core protein involved in repressive condensed heterochromatin formation)/ClrD (H3K9 methyltransferase) complex in *A. nidulans* (Reyes-Dominguez et al., 2010). Similarly, deletion of *laeA* results in the accumulation of heterochromatic marks in the ST cluster in *A. flavus* (Amaike et al., 2011). In *A. fumigatus*, LaeA is required to prevent heterochromatic marks in the promoter of *brlA* (Lind et al., 2018), a key gene for conidiogenesis. A wave of histone 4 acetylation initiated near the *pksA/nor-1* intergenic region of the aflatoxin cluster would allow the conversion of heterochromatin to euchromatin (active gene region) and the biosynthesis of these toxins in *A. parasiticus* (Roze et al., 2007). Chettri et al. (2018) showed that changes in gene expression and dothistromin biosynthesis are associated with higher acetylation (H3K9ac) and lower methylation (H3K9me3 and H3K27me3) of histones in *Dothistroma septosporum*. In *Trichoderma reesei*, 75 genes out of 4,089 detected by chromatin immunoprecipitation with antibodies against histone modifications showed a correlation between regulation by Lae1 and H3K4me2 or H3K4me3 (Karimi-Aghcheh et al., 2013). It should be noted that LaeA is involved in the production of a primary metabolite, citric acid, through epigenetic regulation of *cexA* via the methylation level of histones H3K4 and H3K9 in *A. kawachii* (Kadooka et al., 2020). SM clusters appear to be quenched by heterochromatic marks and are thought to be activated during secondary metabolism by conversion to euchromatin through a process controlled by LaeA (Garcia-Estrada et al., 2018).

In the genus *Penicillium*, much less work has been done on LaeA, which is required for the expression of cellulolytic enzyme genes in *P. oxalicum* (Zhang et al., 2022; Li et al., 2016), for penicillin and PR-toxin biosynthesis in *P. chrysogenum* (Kopke et al., 2013; Kosalkova et al., 2009; Martin et al., 2017), for compactin biosynthesis in *P. citrinum* (Baba et al., 2012) and in *P. digitatum*, 60 down-regulated and 20 upregulated BGC components were identified in a $\Delta laeA$ mutant (Zhu et al., 2020). In *P. expansum*, LaeA regulates patulin biosynthesis and many

other backbone genes including *roqA* (roquefortin biosynthesis) but does not regulate the biosynthesis of communesins, citrinin, or andrastins (Kumar et al, 2017 and 2018). Patulin production is strongly related to the concentration of sucrose in the medium (Kumar et al., 2017) and intrinsic factors of the fruit such as pH, organic acid or phenol composition (Kumar et al., 2018). Deletion of the *laeA* gene results also in decreased virulence in *P. digitatum* (Zhu et al., 2020) and in *P. expansum*, where virulence is strain-dependent (Kumar et al., 2017; Luciano-Rosario et al., 2020). At the epigenetic level, Zhang et al. (2022) showed that TF ClrB and the Tup1-Cyc8 complex allowed LaeA to modify the chromatin structure of the upstream regions of cellulolytic genes in *P. oxalicum*.

In this work, we focused on the roles of LaeA in the pathogenicity and virulence of *P. expansum* on apples and its secondary metabolism. To determine the specific roles of LaeA in *P. expansum*, a *PeΔlaeA* null mutant strain and a complemented *PeΔlaeA:laeA* strain were generated. The pathogenicity and virulence of the wild-type (WT), *PeΔlaeA*, and *PeΔlaeA:laeA* strains were compared in vivo on the ‘Golden Delicious’ cultivar. We assessed the effects of the *laeA* gene deletion on growth, and in vitro macro and microscopic morphology. The metabolome of the *PeΔlaeA* strain was analyzed in vitro on synthetic media, in the dark and in the light, by an untargeted metabolomics approach using LC-HRMS. Transcriptome analysis of the WT and *PeΔlaeA* strains by microarray was also performed.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains, media and culture conditions

The wild-type *Penicillium expansum* strain NRRL 35695 was used in this study. It was isolated from grape berries found in the Languedoc Roussillon region (France). All strains in this study were grown on MEA (Biokar Diagnostics, Allonne, France; 30 g/L malt extract, 15 g/L agar) in the dark for 7 days at 25°C, unless otherwise indicated.

For protoplast preparation, cultures were grown for 12 h on an orbital shaker at 150 rpm and 25°C in 250 mL of yeast extract peptone dextrose (YPD) medium (per liter of medium: 20 g dextrose, 10 g yeast extract, 20 g bactopectone). A spore suspension of 3×10^7 conidia was used to inoculate the medium.

Construction and validation of the *Pe* Δ *laeA* and *Pe* Δ *laeA*:*laeA* strains

The *Pe* Δ *laeA* mutant strain was generated using the homologous recombination strategy. The construction of the deletion mutant strain is described under Supporting Information. Briefly, the hygromycin resistance marker (*hph*), flanked by the DNA sequences that correspond to the 5' upstream and 3' downstream sequences of the *laeA* coding region, was used to replace the *laeA* gene (PEXP_042660). The gene deletion cassette was created by fusion PCR using genomic DNA from *P. expansum* strain NRRL 35695 to amplify the 5' upstream and 3' downstream flanking regions according to (Zetina-Serrano et al., 2020). Following a previously described method (Snini et al., 2016), the WT strain was transformed using the deletion cassette. For the complementation, and to transform protoplasts of *Pe* Δ *laeA* strain, the primers *dlaeAF/dlaeAR* were used to generate the DNA fragment from the WT strain, containing the whole coding *laeA* gene sequence. The sequences of all primers are indicated in Table S4.

Validation of the deletion *Pe* Δ *laeA* strain

Once the deletion cassette inserted and the WT strain transformed, the transformants were screened by different methodological approaches: (i) PCR screening of *laeA*, hygromycin gene, and 5' and 3' locus/deletion cassette junctions (Figure S13), (ii) genome walking to confirm that the selection marker was correctly inserted at the *laeA* locus and that only one copy of the deletion cassette was integrated in the genome of transformants (Figure S14), (iii) RT-qPCR

to check the absence of *laeA* gene expression (Figure S15). Details of the different experimentations are described under the Supporting Information.

In vitro growth, and macroscopic and microscopic morphology of the *PeΔlaeA* strain

The WT, null mutant, and complemented strains were grown on MEA for 7 days at 25°C in the dark. After this incubation period, a spore suspension of each strain was prepared at a concentration of 10⁶ conidia/mL. Ten μL of these spore suspensions were centrally inoculated onto MEA, CYA [10 mL/L concentrated Czapeck (30g/L NaNO₃, 5 g/L MgSO₄ 7H₂O, 0.1 g/L FeSO₄, 5 g/L KCl), 1 mg/L K₂HPO₄, 5 g/L yeast extract, 30 g/L saccharose, 15 g/L agar] and PDA (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; 30 g/L potato extract, 15 g/L agar) media and were incubated at 25°C for 10 days in the dark. An CX41 optical microscope (Olympus, Rungis, France) was used to analyze microscopic characteristics after 7 days of incubation. A SZX9 stereomicroscope (Olympus) was then used to study macroscopic characteristics after 10 days of incubation. All studies were performed in triplicates.

Pathogenicity study and production of patulin

Blue mold development and production of patulin on apples of the WT, null mutant, and complemented strains were assessed through an *in vivo* study performed on Golden Delicious apples. Apples were purchased from a supermarket in Toulouse (Carrefour, France) and surface sterilized with a 2% sodium hypochlorite solution. The experiment was performed as previously described (El Hajj Assaf et al., 2018). Briefly, for each strain, apples were wounded using a sterile toothpick and contaminated with a 10 μL of a spore suspension at 10⁴ conidia/mL. After that, apples were incubated for 14 days in the dark at 25°C. Each day, the diameters of the rotten spots were measured. At the end of the incubation period, these measurements were used to calculate the growth rate and rot volume, according to Baert et al. (2007).

Thereafter, apples were blended to form a puree (MacDonald et al., 2000) in which patulin production was determined by high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD) as described by Zetina-Serrano et al. (2020). Nine biological replicates were performed for each strain.

HPLC-DAD analysis of patulin and chaetoglobosin A

Patulin and, chaetoglobosin A were quantified using the chromatography device Ultimate 3000 HPLC system (Dionex/ThermoScientific). For patulin analysis, parameters described by Zetina-Serrano et al. (2020) were used. Chaetoglobosin A was quantified using a 150 mm x 2 mm, Luna® 5 µm, C18 column (Phenomenex, Le Pecq, France) at 30°C at a flow rate of 0.2 mL/min. Water acidified with 0.05% formic acid served as eluent A, while acetonitrile acidified with 0.05% formic acid served as eluent B. The column was equilibrated with a mixture of 60% solvent A and 40% solvent B. Throughout the 70 minute-program, the mixture of solvents A and B was maintained. The concentration of chaetoglobosin A was measured by a fluorescent detector with an excitation wavelength of 330 nm and an emission wavelength of 485 nm.

Microarray gene expression analysis

Total RNA was extracted and gene expression profiles were performed according to Zetina-Serrano et al. (2020). Four biological replicates of each strain were used to perform the expression analysis.

Statistical Analysis

To analyze the differences between the WT, null mutant, and complemented strains, a student's test as well as a one-way analysis of variance (ANOVA) were used. For a p -value ≤ 0.05 , the differences were considered to be statistically significant. GraphPad Prism 4 Software (San Diego, CA, USA) was used to perform all statistical analysis of the data in this study.

RESULTS

***LaeA* impacts in vitro growth, and macroscopic and microscopic morphology**

The *PeΔ*laeA** strain showed different morphological features in comparison to the WT and *PeΔ*laeA*:*laeA** strains.

Macroscopically, the conidial areas of the WT and *PeΔ*laeA*:*laeA** strains had the normal blue-green color of *P. expansum*. However, the colony of the *PeΔ*laeA** strain showed a blander color, closer to white than to green, on both media tested (Figure 26). In addition, the *PeΔ*laeA** strain displayed a bristle-like appearance with a fluffy texture, while the WT and the *PeΔ*laeA*:*laeA** strains showed a more velvety and granular surface in which conidiophores emerged from submerged hyphae (Figure 26). On both media tested, the *PeΔ*laeA** strain did not produce coremia or exudates while the WT and complemented strains displayed important amounts of these structures on the surface of their colonies (Figure 26).

The WT and complemented strains produced coremia as well as exudates on the surface of colonies, whereas the *PeΔ*laeA** strain was unable to form such structures or produce exudates (Figure 26).

Microscopically, the WT, *PeΔ*laeA**, and *PeΔ*laeA*:*laeA** strains did not show any morphological differences.

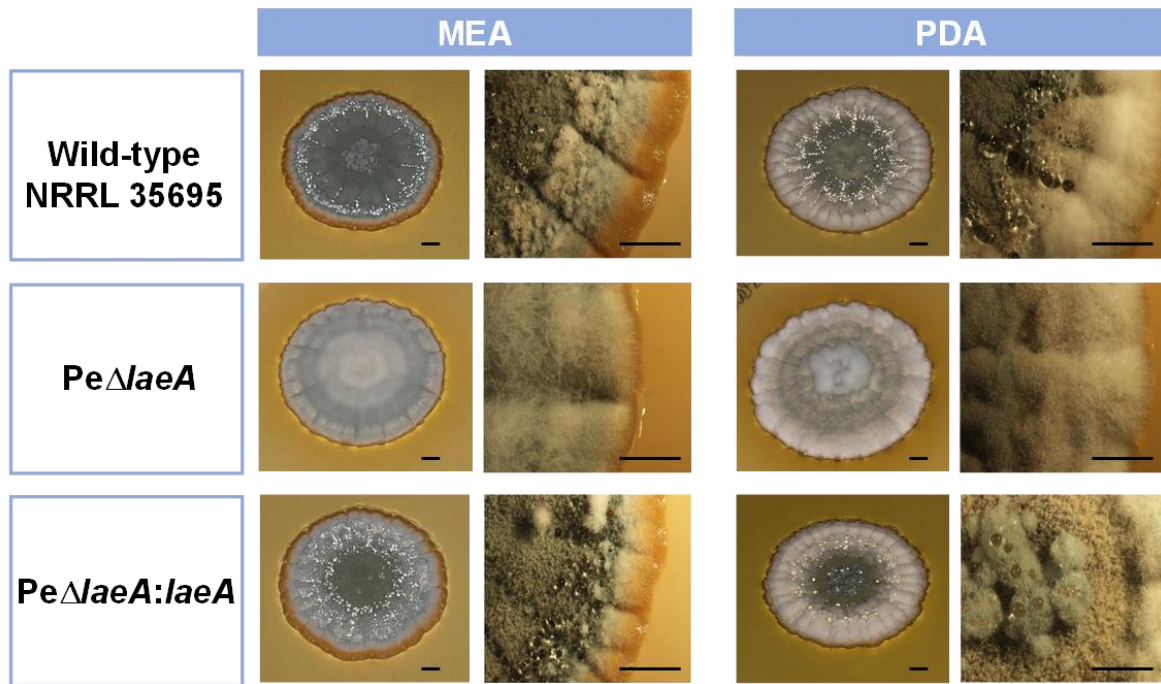


Figure 26. Morphological appearance of *Penicillium expansum* wild type, *PeΔlaeA*, and *PeΔlaeA:laeA* strains. Macroscopic appearance and stereomicroscopic observations (x12) of colonies. Cultures were grown on malt extract agar (MEA) and potato dextrose agar (PDA). Black scale bars represent 1 cm.

LaeA* affects the pathogenicity of *P. expansum

The effect of the *laeA* gene deletion on apple colonization was assessed by infecting fresh Golden Delicious apples with the WT, *PeΔlaeA*, and *PeΔlaeA:laeA* strains and incubating them for 14 days; development, dissemination, and pathogenicity of *P. expansum* were thereafter analyzed (Figure 27).

All along the incubation period, the developmental patterns of the WT and *PeΔlaeA:laeA* strains were identical (Figure 27a). The first six days of incubation did not mark any significant difference in development between all three strains. However, starting the seventh day post-inoculation (dpi), the development of the *PeΔlaeA* strain was delayed in comparison to the WT and *PeΔlaeA:laeA* strains (Figure S16). At 14 dpi, the lesion caused by the *PeΔlaeA* strain was 31.9% smaller than that caused by the WT and 20% smaller than that caused by the *PeΔlaeA:laeA* strain, with lesion diameters of 6.4 ± 0.1 cm, 4.4 ± 0.2 cm, and 5.5 ± 0.3 cm, for the WT, *PeΔlaeA* and *PeΔlaeA:laeA* strains, respectively (Figure 27b). At the end of the

incubation period, the rot volume was calculated according to the method previously described by Baert et al. (2007). The rot volume of apples infected with the *Pe Δ laeA* strain was 63.5% and 56.6% smaller than the rot volume of apples infected with the WT and *Pe Δ laeA:laeA* strains, respectively (Figure 27c).

At the end of the incubation period, patulin was extracted and quantified. In apples infected with the WT and *Pe Δ laeA:laeA* strains respectively, patulin concentrations were $93.3 \pm 28.9 \mu\text{g g}^{-1}$, and $67.4 \pm 10.4 \mu\text{g g}^{-1}$. No patulin was detected in apples infected with the *Pe Δ laeA* strain (Figure 27d).

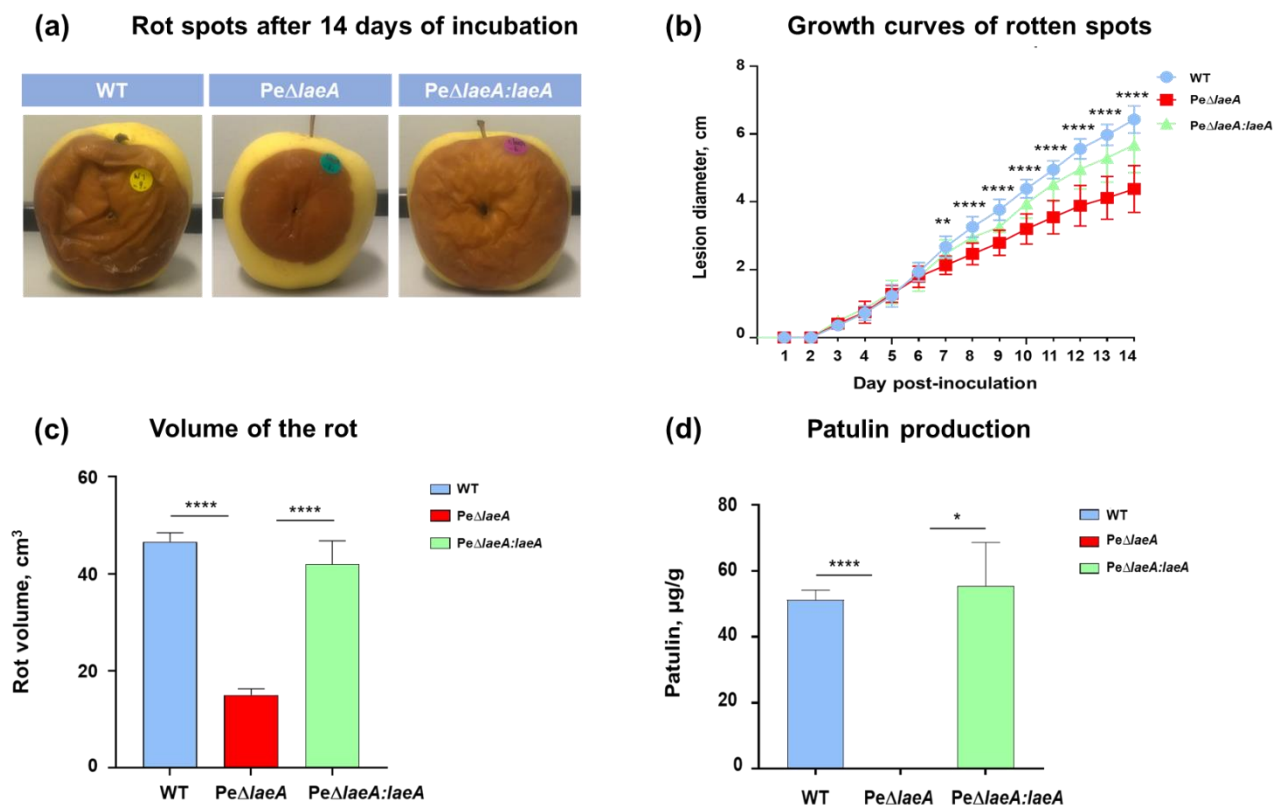


Figure 27. ‘Golden Delicious’ apples infected with the WT, *Pe Δ laeA*, and *Pe Δ laeA:laeA* strains. A) Rot spots after 14 days post-inoculation. B) Growth curves of the rotten spots. Rotten spot diameters were measured daily for 14 days. C) Rot volumes calculated as described by Baert et al. (2007) at the end of the incubation period. D) Patulin production in apples. Patulin production was measured by high-performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD) at 277 nm. Apples were incubated in the dark at 25 °C. Graphs show the mean \pm standard error of the mean (SEM) of nine replicates. * p -value < 0.05; ** p -value < 0.01; **** p -value < 0.0001.

Analysis of the transcriptome in the *PeΔlaeA* mutant strain

To determine the effect of the *laeA* gene deletion on the expression of genes involved in SM biosynthesis, a microarray analysis was realized on 5-day-old colonies of the WT and *PeΔlaeA* strains grown on MEA medium.

To consider genes as significantly differentially expressed, the \log_2 -fold change (\log_2FC) had to be <-1 or >1 and the *p*-value had to be <0.05 .

The *PeΔlaeA* strain had 1,867 significantly differentially expressed genes (DEGs) in comparison to the WT: of these DEGs, 594 were significantly up-expressed and 1,273 were significantly down-expressed.

A more specific analysis was then conducted and the expression of genes involved in patulin, citrinin, and chaetoglobosin A biosynthesis was evaluated (Figure 28).

The 15 genes of the patulin biosynthetic gene cluster were significantly down-regulated in the *PeΔlaeA* strain. Except *patL* and *patD*, 13 genes of the pat cluster are listed in the 25 top up-regulated genes in the *PeΔlaeA* strain. The most down-regulated genes of the pat cluster were *patJ* (PEXP_094450), *patM* (PEXP_094400), *patA* (PEXP_094390), *patO* (PEXP_094420), *patN* (PEXP_094410), and *patC* (PEXP_094370) (Figure 28a). The *patL* gene (PEXP_094430), encoding the pat cluster-specific TF, was the less affected gene with a \log_2FC of -1.15.

All the genes involved in the chaetoglobosin A BGC were significantly down-regulated in the *PeΔlaeA* strain (Figure 28b). The most down-regulated genes were PEXP_074000 ($\log_2FC=-3.53$), PEXP_073990 ($\log_2FC=-3.03$), and PEXP_073970 ($\log_2FC=-2.99$) (Figure 28b). The effect of the *laeA* gene deletion on the expression of genes involved in citrinin biosynthesis was not as important as the effect on the expression of genes involved in patulin and chaetoglobosin biosynthesis (Figure 28c). Nine of the 10 genes of the citrinin cluster were down-regulated, with only five (*citS* (PEXP_005520), *citA* (PEXP_005530), *citB* (PEXP_005540), *citD*

(PEXP_005560), and *citE* (PEXP_005580) having a \log_2FC lower than -1. Only one gene (PEXP_005600) was up-regulated by the deletion of the *laeA* gene, with a \log_2FC of 0.2 (Figure 28c).

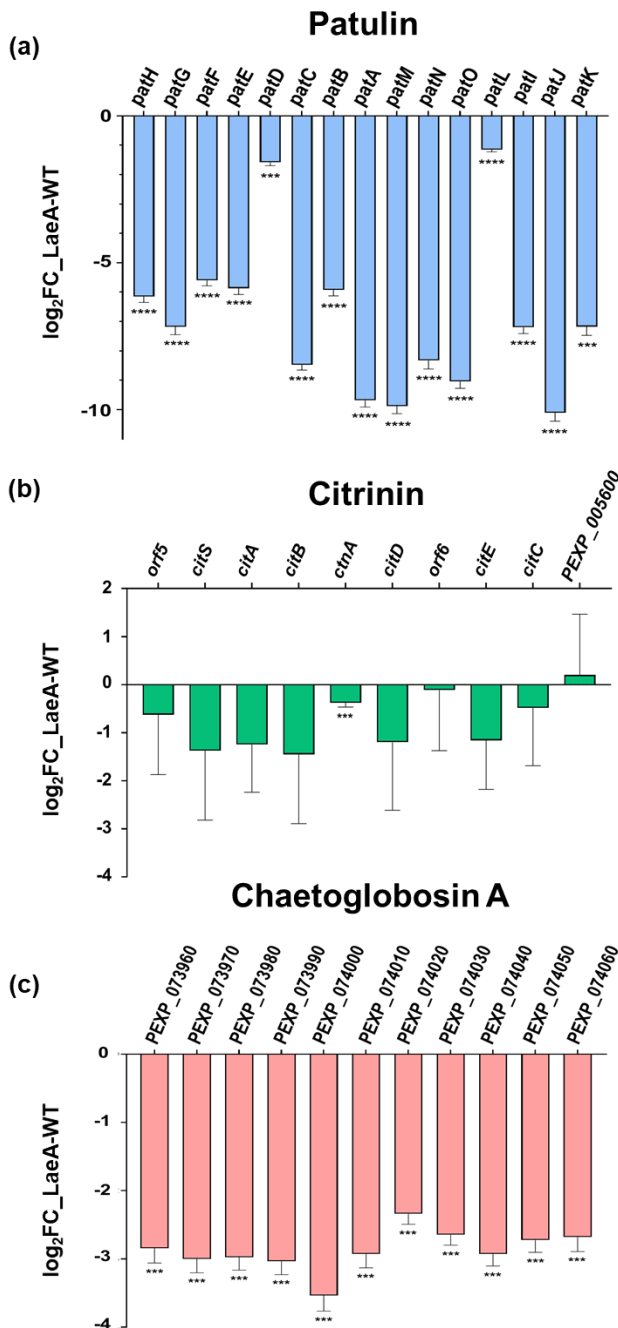


Figure 28. \log_2 fold change (\log_2FC) in the expression of genes belonging to the clusters involved in patulin, citrinin, and chaetoglobosin A biosynthesis in the WT and *PeΔlaeA* strains. A) Patulin cluster (PEXP_094320-PEXP_094460). B) Citrinin cluster (PEXP_005510-PEXP_005600). C) Chaetoglobosin cluster (PEXP_073960-PEXP_074060). Strains were grown for 5 days at 25 °C in the dark on malt extract agar. Graphs show the mean standard error of the mean (SEM) of four replicates. Asterisks indicate significant differences between the WT and *PeΔlaeA* strains. *** p -value < 0.001; **** p -value < 0.0001.

In addition, the expression of other backbone genes predicted by antiSMASH as putatively involved in SM biosynthesis was assessed in the WT and the *PeΔlaeA* strains. These genes included polyketide synthases (PKSs), non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs), dimethylallyl tryptophan synthases (DMATSs), and terpene synthases (TSs).

Results indicated that of the BGCs tested, 30 were significantly differentially expressed in the *PeΔlaeA* strain. Of one hand, eight of these backbone genes were significantly up-regulated. Among them, PEXP_094770 ($\log_2FC=9.87$) and PEXP_094810 ($\log_2FC=6.52$) were in the short list of the most up-regulated genes (Figure 29). These two genes belong to a cluster of eight up-regulated genes (PEXP_094750-PEXP_094820). The PEXP_078820 gene, encoding SidE, a NRPS responsible for fumarylalanine biosynthesis, was also up-regulated ($\log_2FC=1.22$) (Table 8). The PEXP_076200 gene ($\log_2FC=3.86$), PEXP_017960 ($\log_2FC=1.78$), PEXP_013580 ($\log_2FC=1.80$), PEXP_107400 ($\log_2FC=1.24$), and PEXP_086670 ($\log_2FC=1.73$) were significantly up-regulated.

On the other hand, 19 genes were significantly down-expressed. Among them, PEXP_030090 ($\log_2FC=-1.76$) and PEXP_030140 ($\log_2FC=-2.25$) encode respectively a NRPS and a DMATS involved in the roquefortine C biosynthesis (Figure 29). The communesin gene cluster including PEXP_030510 ($\log_2FC=-1.62$) and PEXP_030540 ($\log_2FC=-1.18$) was also down-regulated (Figure 29).

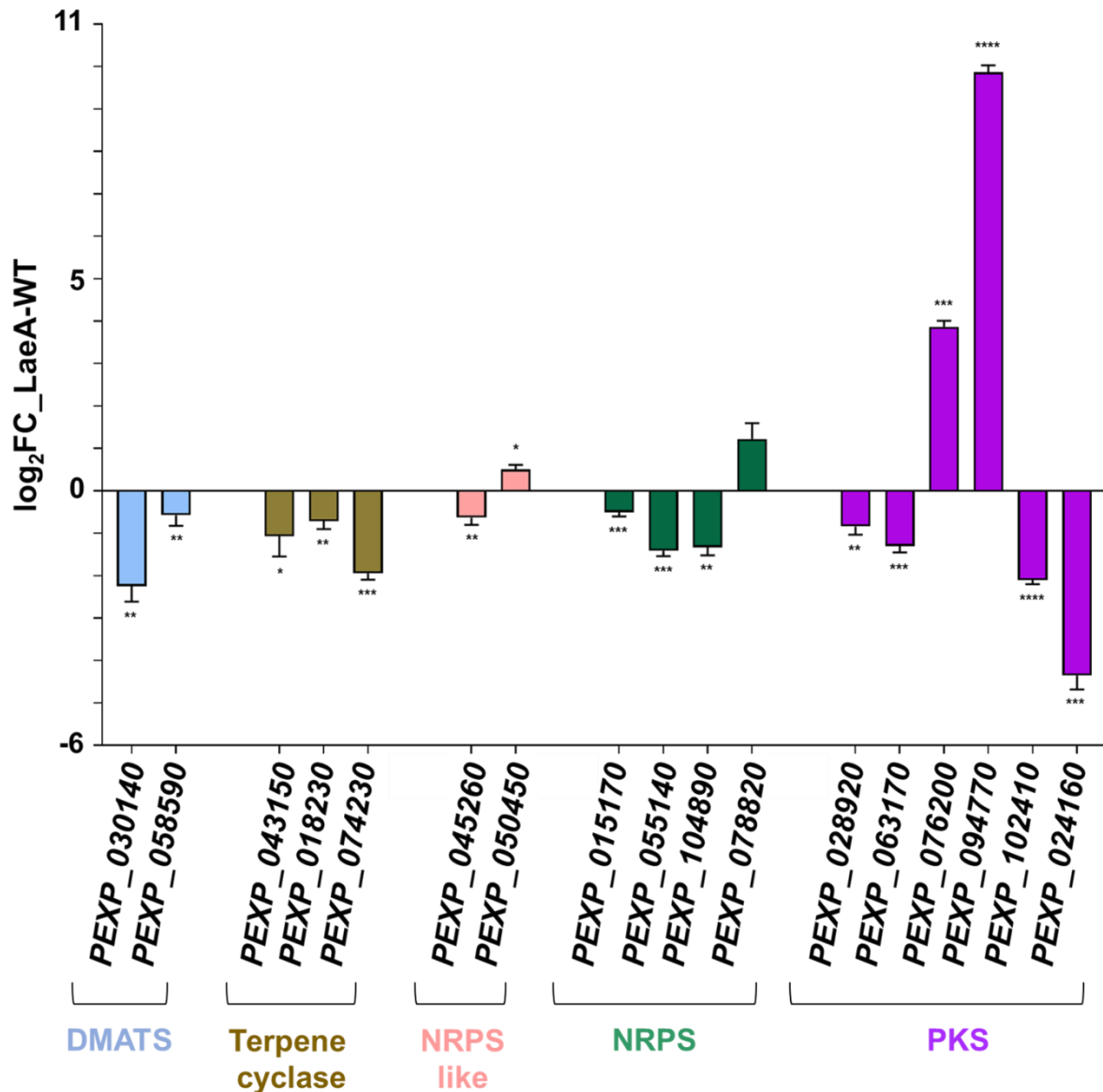


Figure 29. Relative expression of 17 genes encoding other backbone enzymes (dimethylallyl tryptophan synthases (DMATSs), terpene cyclases, non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs), NRPS like, polyketide synthases (PKSs) identified in the d1 strain genome. Graphs show the mean standard error of the mean (SEM) from four replicates. Asterisks show significant differences between the wild type (WT) and *Pe \square laeA* strains. **p*-value < 0.05; ***p*-value < 0.01; ****p*-value < 0.001; *****p*-value < 0.0001.

Added to these genes, PEXP_063170 (log₂FC=-1.30), PEXP_063270 (log₂FC=-1.19), PEXP_102410 (log₂FC=-2.10), PEXP_012360 (log₂FC=-1.63), PEXP_018960 (log₂FC=-1.75), PEXP_024160 (log₂FC=-4.35), PEXP_029660 (log₂FC=-2.22), PEXP_030090 (log₂FC=-1.76), PEXP_043150 (log₂FC=-1.07), PEXP_053630 (log₂FC=-4.42), PEXP_055140 (log₂FC=-1.41), PEXP_058440 (log₂FC=-1.41), PEXP_060620 (log₂FC=-

1.73), PEXP_072870 ($\log_2FC=-1.38$), PEXP_074230 (encoding bicyclogermacrene synthase, $\log_2FC=-1.94$), PEXP_082750 ($\log_2FC=-2.41$), PEXP_095510 ($\log_2FC=-5.15$), PEXP_095540 ($\log_2FC=-5.31$), PEXP_096300 ($\log_2FC=-3.32$), PEXP_104890 (encoding *sidD*, $\log_2FC=-1.33$), and PEXP_096630 ($\log_2FC=-1.44$) were significantly down-regulated in the *Pe Δ laeA* strain. The latter encodes Alb1, the PKS involved in the DHN-melanin biosynthesis. The genes encoding the other enzymes of the melanin biosynthetic pathway were also down-regulated: *arp1* (PEXP_097170), *arp2* (PEXP_097180), *ayg1* (PEXP_097190), and *abr1* (PEXP_097110) (Table 8).

PEXP_070520 ($\log_2FC=-1.88$) encoding the conidiation protein ConF, and PEXP_089660 ($\log_2FC=-2$) encoding another conidiation protein, ConJ, were down-regulated in the *Pe Δ laeA* strain (Table 8).

TABLE 8. Differential expressed genes (DEGs) involved in fungal development, conidiation, siderophore biosynthesis, nitrate assimilation, and ergosterol biosynthesis.

	<i>Penicillium expansum</i> d1 Strain Gene ID	Protein Name	Log ₂ Fold Change PeΔ <i>laeA</i> vs. WT	Adjusted <i>p</i> - Value	Putative Role
Regulation of Development	PEXP_050790	Fcr3	-0.649	1.89 x 10 ⁻⁵	Transcription factor
	PEXP_070520	ConF	-1.88	7.24 x 10 ⁻¹¹	Conidiation protein
	PEXP_089660	ConJ	-2	1.10 x 10 ⁻⁶	Conidiation protein
	PEXP_029020	AbaA	-1.20	1.48 x 10 ⁻⁷	Transcription factor
	PEXP_077410	WetA	-1.05	6.25 x 10 ⁻⁹	DNA-binding transcription factor
	PEXP_040110	PhiA	3.45	2.23 x 10 ⁻¹³	Phialide development protein
	PEXP_049260	BrlA	-0.831	1.38 x 10 ⁻⁶	C2H2 type conidiation transcription factor BrlA
Hydrophobins	PEXP_071760	DewC	-2.27	4.48 x 10 ⁻⁸	-
	PEXP_020490	RodB/ DewB	-0.912	2.08 x 10 ⁻⁵	Rodlet B, Hydrophobic protein
	PEXP_043320	DewD	-1.22	2.11 x 10 ⁻⁷	-
Pigmentation DHN-Melanin Like Pigment	PEXP_096630	Alb1	-1.44	1.39 x 10 ⁻⁹	Putative polyketide synthase
	PEXP_097170	Arp1	-1.95	1.60 x 10 ⁻¹²	Putative protein-Conidial pigmentation
	PEXP_097180	Arp2	-2.15	2.19 x 10 ⁻¹³	HN reductase
	PEXP_097190	Ayg1	-2.62	4.14 x 10 ⁻¹⁴	-
	PEXP_097110	Abr1	-1.20	6.07 x 10 ⁻⁸	Multicopper oxidase
Siderophore biosynthesis	PEXP_104890	SidD	1.33	1.04 x 10 ⁻⁶	Non-ribosomal peptide synthetase
	PEXP_078820	SidE	1.22	2.8 x 10 ⁻³	Fumaryl-L-alanine synthetase
	PEXP_023020	MirB	2.15	2.33 x 10 ⁻⁸	Siderochrome iron transporter MirB
Nitrate assimilation	PEXP_067550	NiaD	1.54	6.78 x 10 ⁻³	Nitrate reductase
	PEXP_067570	CrnA	2.43	1 x 10 ⁻³	Nitrate transporter
Ergosterol Biosynthesis	PEXP_075880	Erg1	1.08	1.20 x 10 ⁻⁶	Squalene epoxidase
	PEXP_027370	Erg11A	2.28	1.73 x 10 ⁻¹⁰	14-alpha sterol demethylase
	PEXP_103680	Erg25a	1.60	7.58 x 10 ⁻⁹	C4-methyl sterol oxidase
	PEXP_097970	Erg2	1.87	1.48 x 10 ⁻¹⁰	C-8 sterol isomerase
	PEXP_062960	Erg3	2.18	3.04 x 10 ⁻⁹	Sterol delta 5-6 desaturase
	PEXP_020190	Erg5a	0.901	3.98 x 10 ⁻⁸	Sterol C22-desaturase
	PEXP_068950	Erg4	-1.31	2.73 x 10 ⁻⁸	C-24 sterol reductase

	PEXP_052380	SrbB	0.779	2.77×10^{-8}	Sterol regulatory element-binding protein HLH transcription factor SrbB
Velvet Protein Family	PEXP_065290	VelB	-0.766	4.41×10^{-8}	Velvet-like protein B
	PEXP_009420	VelC	-0.164	3.62×10^{-2}	Regulator of sexual development
	PEXP_076870	VosA	-0.653	6.10×10^{-5}	Multifunctional regulator of development

LaeA regulates positively patulin and chaetoglobosin A production

To assess the effect of the *laeA* gene deletion on SM production in vitro, patulin and chaetoglobosin A were extracted from colonies of the WT, null mutant, and complemented strains grown on two different culture media (Figure 30).

After 7 days of incubation, the WT and complemented strains produced important amounts of patulin, $1\,468.9 \pm 178.2 \mu\text{g g}^{-1}$ on MEA and $1\,278.6 \pm 47.8 \mu\text{g g}^{-1}$ on PDA, and $807.3 \pm 47.8 \mu\text{g g}^{-1}$ on MEA and $1\,118.1 \pm 208.8 \mu\text{g g}^{-1}$ on PDA, respectively (Figure 30a and b). The *Pe Δ laeA* strain produced low quantities of patulin on MEA, $275.2 \pm 3.0 \mu\text{g g}^{-1}$ (Figure 30a), while no patulin was detected on PDA (Figure 30b).

Chaetoglobosin A was produced by the WT strain, $8.7 \pm 1.7 \mu\text{g g}^{-1}$ on MEA and $22.7 \pm 3.3 \mu\text{g g}^{-1}$ on PDA, and the *Pe Δ laeA:laeA* strain, $8.9 \pm 2.1 \mu\text{g g}^{-1}$ on MEA and $14.0 \pm 1.9 \mu\text{g g}^{-1}$ on PDA (Figure 30e and f). However, the *Pe Δ laeA* strain was unable to produce chaetoglobosin A on any of the two media tested (Figure 30c and 30d).

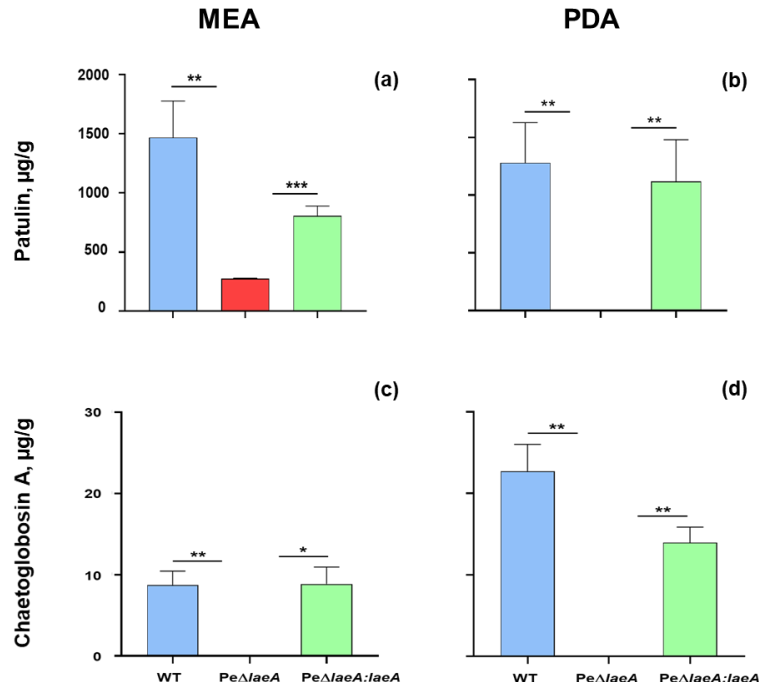


Figure 30. Patulin and chaetoglobosin A production on malt extract agar (MEA) and potato dextrose agar (PDA) media by the wild type (WT), *Pe Δ laeA*, and *Pe Δ laeA:laeA* strains. Strains were grown for 7 days in the dark at 25 °C. Patulin production was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a diode array detector at 277 nm. Chaetoglobosin A production was measured by HPLC coupled to a fluorescent detector at an excitation wavelength of 330 nm and an emission wavelength of 485 nm. Graphs show the mean \pm standard error of the mean (SEM) of three replicates. * p -value < 0.05 ; ** p -value < 0.01 ; *** p -value < 0.001 .

DISCUSSION

The velvet complex is a protein complex composed of three main transcription factors: VeA, VelB, and LaeA. This complex was described more than a decade ago (Ozgür Bayram et al., 2008b) and its mechanism of action was elucidated after many years of research. The discovery of the *velvet* (*veA*) gene in *A. nidulans* (Etta Käfer, 1965) was the starting point that awakened the interest of researchers in this highly conserved complex in filamentous fungi. It all started with the creation of a mutant strain ($\Delta veA1$) in *A. nidulans*, a strain that was deprived of the *veA* gene, in which the specific roles of the transcription factor (VeA) encoded by the latter were determined.

LaeA is a key member of the velvet family of proteins. It has been largely investigated throughout the years and its role in the regulation of several secondary metabolites produced by diverse fungal species has been reported. In *A. nidulans*, *A. fumigatus*, and *A. flavus*, this nuclear methyltransferase (Bok and Keller, 2004), was shown to be involved in the regulation of almost 50% of the BGCs of SMs produced by these species (Bok and Keller, 2004 ; Kale et al., 2008 ; Sarikaya-Bayram et al., 2015 ; Wang et al., 2019). In *P. chrysogenum*, *P. digitatum*, and *P. expansum*, LaeA induced the production of penicillin, tryptoquialanine, and patulin respectively (Kosalková et al., 2009; Kumar et al., 2018; Zhu et al., 2020a). These studies, among numerous others, show the implication of LaeA in the regulation of SM biosynthesis in numerous strains of filamentous fungi (Jain and Keller, 2013).

In the present study, we confirmed the implication of LaeA in the regulation of patulin production by *P. expansum*, both in planta and on synthetic media. On ‘Golden Delicious’ apples, the mutant $Pe\Delta laeA$ strain had a similar developmental profile to the wild type (WT) strain for the first six days post inoculation. However, for the following days, an important decrease in the growth rate of the mutant $Pe\Delta laeA$ strain was observed. These results are identical to those obtained with the mutant $Pe\Delta veA$ (El Hajj Assaf et al., 2018a ; Snini et al.,

2016) and Pe Δ velB strains (Chapter 1 of the thesis) strains. The deletion of the *laeA* gene completely inhibited patulin production in apples. These results show that LaeA plays a crucial role in the ability of *P. expansum* to infect apples.

On both synthetic media tested in this study (malt extract agar and potato dextrose agar), the deletion of the *laeA* gene strongly inhibited the production of patulin and chaetoglobosin A. In a previous study conducted by El Hajj Assaf et al. (2018), VeA was shown to up-regulate the production of chaetoglobosin A on synthetic media. Once again, these findings strengthen the hypothesis that the members of the velvet family of proteins interact together to promote production of SMs by filamentous fungi.

The effect of the *laeA* gene deletion on the expression of genes involved in patulin, citrinin, and chaetoglobosin A clusters was evaluated. All genes involved in patulin and chaetoglobosin A biosynthesis were significantly down-regulated in the mutant Pe Δ laeA strain. The least affected cluster of the three is the citrinin BGC: of the 10 genes involved in the cluster, only five were significantly down-regulated, whereas one gene (PEXP_005600) was up-regulated in the Pe Δ laeA strain. All these results show that, in addition to patulin, the production of chaetoglobosin A is positively regulated by LaeA whereas this global transcription factor does not strongly affect the biosynthesis of citrinin in *P. expansum*. Our results are in agreement with the previously published results of Kumar et al. (2016), who showed that LaeA positively regulates the biosynthesis of chaetoglobosin A and patulin, but does not play a role in the regulation of the biosynthesis of citrinin in *P. expansum*.

LaeA was also involved in the regulation of several other backbone genes, including those involved in roquefortine C biosynthesis.

LaeA is also involved in the regulation of genes other than those involved in the biosynthesis of SMs. It positively regulates *brlA* ($\text{Log}_2\text{FC}=-0.851$), *abaA*, and *wetA*. Seventy-two percent of the genes identified as similarly regulated to *wetA* in Δ *brlA* strains of *P.*

expansum and *P. rubens* (Sigl et al., 2011; Zetina-Serrano et al., 2020b) were down-regulated in the *PeΔlaeA* strain (Table S5). Among them are genes involved in the DHN-melanin biosynthesis pathway. The link between LaeA and the melanization was previously reported in *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *P. chrysogenum*, and *Cochliobolus heterostrophus* (Bok and Keller, 2004; Kosalková et al, 2009 , Wu et al, 2012). Similarly to *A. nidulans* and *A. fumigatus*, the deletion of *laeA* resulted in decreased expression of the DHN-melanin genes (Bok and Keller, 2004; Perrin et al, 2007) while in *C. hererostrophus*, the deletion of *laeA* enhanced the mycelial pigmentation. In *P. chrysogenum*, pigmentation defects were observed suggesting a down-regulation of DHN-melanin biosynthetic genes.

In *A. nidulans*, ConF and ConJ are two conidiation proteins that are expressed during the formation of conidia (Suzuki et al., 2013). In the *PeΔlaeA* strain, the *conF* and *conJ* genes encoding these two conidiation proteins were strongly down-regulated. The implication of LaeA in the regulation of conidiation was reported in several species of filamentous fungi (Crespo-Sempere et al., 2013 ; Estiarte et al., 2016 ; Kale et al., 2008 ; Kim et al., 2013 ; Liu et al., 2016 ; Wang et al., 2019 ; Zhang et al., 2016). The results obtained in this study showed the conservation of this role of LaeA in *P. expansum*.

Genes involved in the production of hydrophobins (DewB, DewC, and DewD) are positively regulated by LaeA. Hydrophobins play a role in the formation of aerial hyphae and conidia (Ball et al., 2020 ; Wosten et al., 1993) and contribute to host infection by allowing the dispersal of conidia and adsorption of pathogenic filamentous fungi on host surfaces (Aimanianda et al., 2009 ; Cai et al., 2020 ; Paris et al., 2003). In *A. fumigatus*, WT spores were found to contain 60% more hydrophobin RodA than spores of *ΔlaeA* strain (Dagenais et al., 2010). A comparative proteomic analysis of *A. flavus* the WT and *ΔlaeA* strains, when grown on corn, also showed a lower level of RodA in the *ΔlaeA* strain (Lv et al., 2018)

LaeA positively regulates *sidE*, involved in the biosynthesis of fumarylalanine in *Aspergillus fumigatus* (Perrin et al., 2007) under low iron concentration in contrast to what was observed in the *PeΔlaeA* strain under normal conditions.

We observed that LaeA represses the expression of *niaD* and *crnA* genes. The implication of LaeA in the regulation of nitrate metabolism has already been reported in *Fusarium oxysporum* and *A. flavus*, although in these two species LaeA activates the expression of *niaD* and *crnA* orthologous genes (Lòpes-Berges et al., 2014). The expression of the *nmrA* gene, which encodes the nitrogen metabolite repressor protein, is decreased in the *PeΔlaeA* strain. In the fungal cell, this protein interacts by binding to the C-terminal region of AreA to prevent the activation of nitrogen catabolism (Lamb et al., 2004). In *A. flavus*, the deletion of *nmrA* increased the expression level of *niiA* and *niaD* genes (Han et al., 2016). In the *PeΔlaeA* strain, a decrease in *nmrA* expression could lead to the observed up-regulation of the *niaD* and *crnA* genes.

Some of the most down-regulated DEGs include three genes coding for antifungal proteins: PEXP_059300, PEXP_018930, and PEXP_041170. These proteins belong to class A, class B, and class C of a new classification of antifungal proteins proposed by Garrigues et al. (2016). Among the three proteins, only PeAfpA was observed in culture supernatants of *P. expansum*. The antifungal activity of the three proteins was assessed against several plant pathogens (Garrigues et al., 2018). PeAfpA showed the greatest antifungal activity, whereas PeAfpC displayed no antifungal activity and its function remains unknown.

In the *PeΔlaeA* strain, all significantly DEGs involved in ergosterol biosynthesis were up-regulated (*erg1*, *erg11A*, *erg25A*, *erg2*, *erg3*, and *erg5a*). In *A. fumigatus*, the deletion of the homologous *erg11A*, *erg25A*, or *erg5a* results in no difference in the production of ergosterol (Long et al., 2017).

Nevertheless, it was only the gene encoding the C-24 sterol reductase, *erg4*, that was down-regulated in the *PeΔlaeA* strain. In *A. fumigatus*, this enzyme is required for the final step in the biosynthesis of ergosterol (Long et al., 2017).

The lack of the *laeA* gene had no significant effect on the expression of the other members of the velvet complex. Similar results were previously obtained with a deletion mutant *ΔveA* strain in *P. expansum*, in which the absence of VeA caused no change in the expression levels of *laeA* and *velB* (El Hajj Assaf et al., 2018).

CONCLUSION

In conclusion, the present study assessed some of the roles of LaeA in *P. expansum*, a widespread filamentous fungus that causes fruit decay. The results obtained in this work showed the involvement of LaeA in the development of this necrotrophic fungus, both in vitro and in planta. The production of patulin and chaetoglobosin A by the *PeΔlaeA* strain was strongly affected on synthetic media and on ‘Golden Delicious’ cultivar, compared to on the WT strain. LaeA plays a key role in the regulation of secondary metabolism in *P. expansum*. The microarray assay conducted in this study showed the implication of LaeA in the positive regulation of the expression of all genes involved in patulin and chaetoglobosin A biosynthesis, and most genes involved in citrinin biosynthesis. In addition to secondary metabolism, LaeA was also shown to regulate several physiological processes in *P. expansum* including conidiation, iron uptake, nitrate assimilation, and ergosterol biosynthesis. Some physiological processes involved in primary metabolism (iron uptake, nitrate assimilation, or ergosterol biosynthesis) are negatively regulated by LaeA whereas LaeA regulates positively genes involved in conidiation including the master genes *brlA*, *wetA*, and *abaA*, as well as genes encoding pigments or hydrophobins that were all repressed in the absence of this global transcription factor.

CREDIT AUTHOR STATEMENTS

Nadia Tahtah: Investigation, Formal Analysis, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing. Chrystian Zetina-Serrano: Investigation. Ophélie Rocher: Investigation. Selma P. Snini: Investigation, Writing - Review & Editing. Claire Naylies: Investigation. Yannick Lippi: Data Curation. Emilien L. Jamin: Formal Analysis. Isabelle P. Oswald: Writing - Review & Editing, Project administration. Sophie Lorber: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – Original Draft, Writing - Review & Editing, Project administration, Funding acquisition. Olivier Puel: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal Analysis, Writing – Original Draft, Writing - Review & Editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition. All authors read and approved the final manuscript.

DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

ACKNOWLEDGEMENTS AND FUNDING

This research was funded by CASDAR AAP RT 794 2015, grant number 1508, and by French National Research Agency PATRISK project (grant number ANR-17-CE21-0008). Nadia Tahtah was supported by doctoral fellowship from CNRS/ Saint-Joseph University and by funds from Animal Health department of INRAE.

APPENDIX A. SUPPORTING INFORMATION

Supplementary data associated with this article are available in the online version.

REFERENCES

- Abad A, Fernandez-Molina JV, Bikandi J, Ramirez A, Margareto J, Sendino J, Hernando FL, Ponton J, Garaizar J, Rementeria A. 2010. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. Rev Iberoam Micol 27:155e182. doi: 10.1016/j.riam.2010.10.003.
- Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, Clavaud C, Paris S, Brakhage A., Kaveri SV, Romani L, Latg, J-P. 2009. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. Nature 460, 1117-1121. doi: 10.1038/nature08264.
- Amaike S, Keller NP. 2011. *Aspergillus flavus*. Annu Rev Phytopathol 49:107-133. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095221.
- Amare MG, Keller NP. 2014. Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. Fungal Genet Biol 66:11-18. doi: 10.1016/j.fgb.2014.02.008.
- Baba S, Kinoshita H, Nihira T. 2012. Identification and characterization of *Penicillium citrinum* VeA and LaeA as global regulators for ML-236B production. Curr Genet 58:1-11. doi: 10.1007/s00294-011-0359-x.
- Baert K, Devlieghere F, Flyps ., Oosterlinck M, Ahmed M, Rajković A, Verlinden B, Nicolai B, Debevere J, Meulenaer BD. 2007. Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. Int J Food Microbiol 119:170-181. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2007.07.061.
- Ball SR, Kwan AH, Sunde M. 2020. Hydrophobin rodlets on the fungal cell wall. Curr Top Microbiol Immunol 425:29-51. doi: 10.1007/82_2019_186.

- Ballester A-R, Marcet-Houben M, Levin E, Sela N, Selma-Lázaro C, Carmona L et al. 2015. Genome, transcriptome, and functional analyses of *Penicillium expansum* provide new insights into secondary metabolism and pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interac* 28:232-248. doi: 10.1094/MPMI-09-14-0261-FI.
- Bartholomew HP, Bradshaw MJ, Macarisin O, Gaskins VL, Fonseca JM, Jurick II WM. 2022. More than a virulence factor: patulin is a non-host-specific toxin that inhibits postharvest phytopathogens and requires efflux for *penicillium* tolerance. *Phytopathology* 112: 1165-1174. doi: 10.1094/PHYTO-09-21-0371-R.
- Bayram O, Braus GH. 2012. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev* 36:1-24. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00285.x.
- Bayram O, Krappmann S, Ni M, Bok JW, Helmstaedt K, Valerius O, Braus-Stromeyer S, Kwon N-J, Keller NP, Yu J-H, Braus GH. 2008. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320, 1504-1506. doi: 10.1126/science.1155888.
- Bills GF, Gloer JB. 2016. Biologically active secondary metabolites from the fungi. *Microbiol Spectrum* 4:FUNK-0009-2016. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0009-2016.
- Bok JW, Keller NP. 2004. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell* 3:527-535. doi: 10.1128/EC.3.2.527-535.2004.
- Bok JW, Balajee SA, Marr KA, Andes D, Nielsen KF, Frisvad JC, Keller NP. 2005. LaeA, a regulator of morphogenetic fungal virulence factors. *Eukaryot Cell* 4:1574-1582. doi: 10.1128/EC.4.9.1574-1582.2005.

- Bok JW, Noordermeer D, Kale SP, Keller NP. 2006. Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 61:1636-1645. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05330.x.
- Bok JW, Chiang Y-M, Szewczyk E, Reyes-Dominguez Y, Davidson AD, Sanchez JF, Lo H-C, Watanabe K, Strauss J, Oakley BR, Wang CCC, Keller, NP. 2009. Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nat Chem Biol* 5:462-464. doi: 10.1038/nchembio.177.
- Bok JW, Soukup AA, Chadwick E, Chiang Y-M, Wang CCC, Keller NP. 2013. VeA and MvIA repression of the cryptic orsellinic acid gene cluster in *Aspergillus nidulans* involves histone 3 acetylation. *Mol Microbiol* 89:963-974. doi: 10.1111/mmi.12326.
- Brakhage AA. 2013. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat Rev Microbiol* 11:21-32. doi: 10.1038/nrmicro2916.
- Butchko RAE, Adams TH, Keller NP. 1999. *Aspergillus nidulans* mutants defective in *stc* gene cluster regulation. *Genetics* 153:715-720. doi: 10.1093/genetics/153.2.715.
- Butchko RAE, Brown DW, Busman M, Tudzynski B, Wiemann P. 2012. Lae1 regulates expression of multiple secondary metabolite gene clusters in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol* 49:602-612. doi: 10.1016/j.fgb.2012.06.003.
- Cai F, Gao R, Zhao Z, Ding M, Jiang S, Yagtu C, Zhu H, Zhang J, Ebner T, Mayrhofer-Reinhartshuber M, Kainz P, Chenthamara K, Akcapinar GB, Shen Q, Druzhinina IS. 2020. Evolutionary compromises in fungal fitness: hydrophobins can hinder the adverse dispersal of conidiospores and challenge their survival. *ISME J* 14:2610–2624. doi: 10.1038/s41396-020-0709-0.

- Calvo AM, Wilson RA, Bok, JW, Keller, NP. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:447-459. doi: 10.1128/MMBR.66.3.447-459.2002.
- Cheng M, Zhao S, Lin C, Song J, Yang Q. 2018. Requirement of LaeA for sporulation, pigmentation and secondary metabolism in *Chaetomium globosum*. *Fungal Biol* 2012, 125:305-315. doi: 10.1016/j.funbio.2020.11.008. *Mol Microbiol* 107:508-522. doi: 10.1111/mmi.13898.
- Chettri P, Dupont P-Y, Bradshaw R. 2017. Chromatin-level regulation of the fragmented dothistromin gene cluster in the forest pathogen *Dothistroma septosporum*: Chromatin regulation of a fragmented cluster. *Mol Microbiol* 107:508-522. doi: 10.1111/mmi.13898.
- Crespo-Sempere A, Marin S, Sanchis V, Ramos AJ. 2013. VeA and LaeA transcriptional factors regulate ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. *Int J Food Microbiol* 166:479-486. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.027.
- Dagenais TR, Giles SS, Aimanianda V, Latgé JP, Hull CM, Keller NP. 2010. *Aspergillus fumigatus* LaeA-mediated phagocytosis is associated with a decreased hydrophobin layer. *Infect Immun* 78:823-829. doi: 10.1128/IAI.00980-09.
- EC Commission Regulation (2006). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Brussels: The Commission of the European Communities.
- El Hajj Assaf, C., Snini, S.P., Tadrist, S., Bailly, S., Naylies, C., Oswald, I.P., Lorber, S., Puel, O. 2018. Impact of veA on the development, aggressiveness, dissemination and secondary metabolism of *Penicillium expansum*. *Mol Plant Pathol* 19:1971-1983. doi: 10.1111/mpp.12673.

- Estiarte N, Lawrence CB, Sanchis V, Ramos AJ, Crespo-Sempere A. 2016. LaeA and VeA are involved in growth morphology, asexual development, and mycotoxin production in *Alternaria alternata*. *Int J Food Microbiol* 238:153-164. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.003.
- Garcia-Estrada C, Dominguez-Santos R, Kosalkova K, Martin J-F. 2018. Transcription factors controlling primary and secondary metabolism in filamentous fungi: The β -lactam paradigm. *Fermentation* 4:47. doi:10.3390/fermentation4020047.
- Garrigues S, Gandía M, Marcos JF. 2016. Occurrence and function of fungal antifungal proteins: a case study of the citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:2243-2256. doi: 10.1007/s00253-015-7110-3.
- Garrigues S, Gandía M, Castillo L, Coca M, Marx F, Marcos JF, Manzanares P. 2018. Three antifungal proteins from *Penicillium expansum*: different patterns of production and antifungal activity. *Front Microbiol* 9:2370. doi: 10.3389/fmicb.2018.02370.
- Griffiths S, Saccomanno B, de Wit PJGM, Collemare J. 2015. Regulation of secondary metabolite production in the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Fungal Genet Biol* 84:52-61. doi: 10.1016/j.fgb.2015.09.009.
- Han, X., Qiu, M., Wang, B., Yin, W.-B., Nie, X., Qin, Q., Ren, S., Yang, K., Zhang, F., Zhuang, Z., Wang, S., 2016. Functional Analysis of the Nitrogen Metabolite Repression Regulator Gene *nmrA* in *Aspergillus flavus*. *Front. Microbiol.* 7.
- He Y, Cox RJ. 2016. The molecular steps of citrinin biosynthesis in fungi. *Chem Sci* 7:2119-2127. doi: 10.1039/C5SC04027B.
- He T, Wang Y, Du L, Li F, Hu Q, Cheng G, Wang W. 2020. Overexpression of global regulator LaeA induced secondary metabolite production in *Aspergillus versicolor* 0312. *Rec Nat Prod* 14:387-394. doi: 10.25135/rnp.183.20.03.1593.

- Jain, S., Keller, N. 2013. Insights to fungal biology through LaeA sleuthing. *Fungal Biol Rev* 27 51-59. doi: 10.1016/j.fbr.2013.05.004.
- Jiang T, Wang M, Li L, Si J, Song B, Zhou C, Yu M, Wang X, Zhang Y, Ding G, Zou Z. 2016. Overexpression of the global regulator LaeA in *Chaetomium globosum* leads to the biosynthesis of chaetoglobosin Z. *J Nat Prod* 79:2487-2494. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00333.
- Kadooka C, Nakamura E, Mori K, Okutsu K, Yoshizaki Y, Takamine K, Goto M, Tamaki H, Futagamia T. 2020. Laea controls citric acid production through regulation of the citrate exporter-encoding *cexa* gene in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*. *Appl Environ Microbiol* 86:e01950-19. doi: 10.1128/AEM.01950-19.
- Käfer, E., 1965. Origins of Translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52, 217-232.
- Kale SP, Milde L, Trapp MK, Frisvad JC, Nancy P, Keller NP, Bok JW. 2008. Requirement of LaeA for secondary metabolism and sclerotial production in *Aspergillus flavus*. *Fungal Genet Biol*. 45:1422-1429. doi: 10.1016/j.fgb.2008.06.009.
- Karimi-Aghcheh R, Bok JW, Phatale PA, Smith KM, Baker SE, Lichius A, Omann M, Zeilinger S, Seiboth B, Rhee C, Keller NP, Freitag M, Kubicek CP. 2013. Functional analyses of *Trichoderma reesei* LAE1 reveal conserved and contrasting roles of this regulator. *G3* 3:369-378. doi: 10.1534/g3.112.005140/-/DC1.
- Keller NP. 2019. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat Rev Microbiol* 17:167-180. doi: 10.1038/s41579-018-0121-1.
- Khan I, Xie W-L, Yu Y-C, Sheng H, Xu Y, Jia-Qi Wang J-Q, Debnath SC, Xu J-Z, Zheng D-Q, Ding W-J, Wang P-M. 2020. Heteroexpression of *Aspergillus nidulans laeA* in marine-derived fungi triggers upregulation of secondary metabolite biosynthetic genes. *Mar. Drugs* 18:652. doi:10.3390/md18120652.

- Kim H-K, Lee S, Jo S-M, McCormick SP, Butchko RAE, Proctor RH, Yun S-H. 2013. Functional roles of *FgLaeA* in controlling secondary metabolism, sexual development, and virulence in *Fusarium graminearum*. PLoS ONE 8:e68441. doi: 10.1371/journal.pone.0068441.
- Kopke K, Hoff B, Bloemendal S, Katschorowski A, Kamerewerd J, Kück U. 2013. Members of the *Penicillium chrysogenum* velvet complex play functionally opposing roles in the regulation of penicillin biosynthesis and conidiation. Eukaryot Cell 12:299-310. doi: 10.1128/EC.00272-12.
- Kosalkova K, Garcia-Estrada C, Ullan RV, Godio RP, Feltre R, Teijeira F, Mauriz E, Martin JF. 2009. The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. Biochimie 91:214e225. doi: 10.1016/j.biochi.2008.09.004.
- Kumar D, Barad S, Chen Y, Luo X, Tannous J, Dubey A, Matana Ng, Tian S, Li B, Nancy Keller NP, Prusky D. 2017. LaeA regulation of secondary metabolism modulates virulence in *Penicillium expansum* and is mediated by sucrose. Mol Plant Pathol 18:1150-1163. doi: 10.1111/mpp.12469.
- Kumar D, Tannous J, Sionov E, Nancy Keller NP, Prusky D. 2018. Apple intrinsic factors modulating the global regulator, LaeA, the patulin gene cluster and patulin accumulation during fruit colonization by *Penicillium expansum*. Front Plant Sci 9: 1094. doi: 10.3389/fpls.2018.01094.
- Lamb, H.K., Ren, J., Park, A., Johnson, C., Leslie, K., Cocklin, S., Thompson, P., Mee, C., Cooper, A., Stammers, D.K., Hawkins, A.R., 2004. Modulation of the ligand binding properties of the transcription repressor NmrA by GATA-containing DNA and site-directed mutagenesis. Protein Sci. 13, 3127–3138. <https://doi.org/10.1110/ps.04958904>

- Lan N, Yue Q, An Z, Bills GF. 2020. Apc.LaeA and Apc.VeA of the velvet complex govern secondary metabolism and morphological development in the echinocandin-producing fungus *Aspergillus pachycristatus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 47:155-168. doi: 10.1007/s10295-019-02250-x.
- Li B, Zong Y, Du Z, Chen Y, Zhang Z, Qin Get al. 2015. Genomic characterization reveals insights into patulin biosynthesis and pathogenicity in *Penicillium* species. *Mol Plant-Microbe Interact* 28:635-647. doi: 10.1094/MPMI-12-14-0398-FI.
- Li Y, Zheng X, Zhang X, Bao L, Zhu Y, Qu Y, Zhao J, Qin Y. 2016. The different roles of *Penicillium oxalicum* LaeA in the production of extracellular cellulase and β -xylosidase. *Front Microbiol* 7:2091. doi: 10.3389/fmicb.2016.02091.
- Lim FY, Hou Y, Chen Y, Oh JH, Lee I, Bugni TS, Keller N.P. 2012. Genome-based cluster deletion reveals an endocrocin biosynthetic pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* 78:4117e4125. doi: 10.1128/AEM.07710-11.
- Lind AL, Lim FY, Soukup AA, Keller NP, Rokas A. 2018. An LaeA- and BrlA-dependent cellular network governs tissue-specific secondary metabolism in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *mSphere* 3:e00050-18. doi: 10.1128/mSphere.00050-18.
- Lind AL, Smith TD, Saterlee T, Calvo AM, Rokas A. 2016. Regulation of secondary metabolism by the velvet complex is temperature-responsive in *Aspergillus*. *G3 (Bethesda)* 6(4):4023-4033. doi: 10.1534/g3.116.033084.
- Liu Q, Cai L, Shaoa Y, Zhou Y, Li M, Wang X, Chen F. 2016. Inactivation of the global regulator LaeA in *Monascus ruber* results in a species-dependent response in sporulation and secondary metabolism. *Fungal Biol* 120:297-305. doi: 10.1016/j.funbio.2015.10.008.

- Long N, Xu X, Zeng Q, Sang H, Lu L. 2017. Erg4A and Erg4B Are Required for conidiation and azole resistance via regulation of ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* 83:e02924-16. doi: 10.1128/AEM.02924-16.
- López-Berges, M.S., Hera, C., Sulyok, M., Schäfer, K., Capilla, J., Guarro, J., Di Pietro, A., 2014. The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Mol. Microbiol.* 87, 49–65. <https://doi.org/10.1111/mmi.12082>.
- Luciano-Rosario D, Keller NP, Jurick II WM. 2020. *Penicillium expansum*: biology, omics, and management tools for a global postharvest pathogen causing blue mould of pome fruit. *Mol plant Pathol* 21:1391-1404. doi: 10.1111/mpp.12990.
- Lv Y, Lv A, Zhai H, Zhang S, Li L, Cai J, Hu Y. 2018. Insight into the global regulation of *laeA* in *Aspergillus flavus* based on proteomic profiling. *Int J Food Microbiol* 284:11-21. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.024.
- MacDonald S, Long M, Gilbert J, Felgueiras I. 2000. Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: collaborative study. *J AOAC Int* 83:1387-1394. doi: 10.1093/jaoac/83.6.1387.
- Maor U, Barda O, Sadhasivam S, Bi Y, Levin E, Zakin V, Prusky DB, Sionov E. 2021. Functional roles of LaeA, polyketide synthase, and glucose oxidase in the regulation of ochratoxin A biosynthesis and virulence in *Aspergillus carbonarius*. *Mol Plant Pathol* 22:117-129.. doi: 10.1111/mpp.13013.
- Martin JF. 2017. Key role of LaeA and velvet complex proteins on expression of β -lactam and PR-toxin genes in *Penicillium chrysogenum*: cross-talk regulation of secondary metabolite pathways. *J Ind Microbiol Biotechnol* 44:525-535. doi: 10.1007/s10295-016-1830-y.

- Oda K, Kobayashi A, Ohashi S, Sano M. 2011. *Aspergillus oryzae laeA* regulates kojic acid synthesis genes. *Biosci Biotechnol Biochem* 75:1832-1834. doi: 10.1271/bbb.110235.
- Palmer JM, Keller NP. 2010. Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter? *Curr Opin Microbiol* 13:431-436. doi: 10.1016/j.mib.2010.04.008.
- Paris S, Debeaupuis J-P, Crameri R, Carey M, Charlès F, Prévost MC, Schmitt C, Philippe B, Latgé JP. 2003. Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* 69 :1581–1588. doi: 10.1128/AEM.69.3.1581-1588.2003.
- Price MS, Yu J, Nierman WC, Kim H, Pritchard B, Jacobus CA, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA. 2006. The aflatoxin pathway regulator AflR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. *FEMS Microbiol Lett* 255:275-279. doi: 10.1111/j.1574-6968.2005.00084.x.
- Reyes-Dominguez Y, Bok JW, Berger H, Shwab EK, Basheer A, Gallmetzer A, Scazzocchio C, Keller N, Strauss J. 2010. Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 76:1376-1386. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07051.x.
- Roze LV, Arthur AE, Hong S-Y, Chanda A, Linz JE. 2007. The initiation and pattern of spread of histone H4 acetylation parallel the order of transcriptional activation of genes in the aflatoxin cluster. *Mol Microbiol* 66:713-726. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05952.x.
- Saha P, Ghosh S, Roy-Barman S. 2020. *MoLAEA* Regulates Secondary Metabolism in *Magnaporthe oryzae*. *mSphere* 5:e00936-19. doi: 10.1128/mSphere.00936-19.
- Sarikaya Bayram O, Bayram O, Valerius O, Park HS, Irniger S, Gerke J, Ni M, Han K-H, Yu J-H, Braus GH. 2010. LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity. *PLoS Genet*, 6: e1001226. doi:10.1371/journal.pgen.1001226.

- Sarikaya-Bayram O, Palmer JM, Keller N, Braus GH, Bayram O. 2015. One Juliet and four Romeos: VeA and its methyltransferases. *Front Microbiol* 6:1. doi: 10.3389/fmicb.2015.00001.
- Shwab EK, Bok JW, Tribus M, Galehr J, Graessle S, Keller NP. 2007. Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryot Cell* 6:1656-1664. doi: 10.1128/EC.00186-07.
- Sigl C, Haas H, Specht T, Pfaller K, Kürnsteiner H, Zadra I. 2011. Among Developmental Regulators, StuA but Not BrlA Is Essential for Penicillin V Production in *Penicillium chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol* 77:972-982. <https://doi.org/10.1128/AEM.01557-10>.
- Snini SP, Tannous J, Heuillard P, Bailly S, Lippi Y, Zehraoui E. et al. 2016. The patulin is a cultivar-dependent aggressiveness factor favoring the colonization of apples by *Penicillium expansum*. *Mol Plant Pathol* 17:920-930. doi: 10.1111/mpp.12338.
- Steinchen W, Lackner G, Yasmin S., Schrettl M, Dahse HM, Haas H, Hoffmeister D. 2013. Bimodular peptide synthetase SidE produces fumarylalanine in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* 79:6670-6676. doi: 10.1128/AEM.02642-13.
- Strauss J, Reyes-Dominguez Y. 2011. Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. *Fungal Genet Biol* 48:62-69. doi:10.1016/j.fgb.2010.07.009.
- Sugui JA, Pardo J, Yun C, Chang YC, Müllbacher A, Zarembek KA, Galvez EM, Brinster L, Zervas P, Gallin JI, Simon MM, Kwon-Chung KJ. 2007. Role of *laeA* in the regulation of *alb1*, *gliP*, conidial morphology, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* 6:1552-1561. doi: 10.1128/EC.00140-07.

- Suzuki S, Sarikaya Bayram Ö, Bayram Ö, Braus GH. 2013. conF and conJ contribute to conidia germination and stress response in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 56, 42-53. doi: 10.1016/j.fgb.2013.04.008.
- Takao K, Akagi Y, Tsuge T, Harimoto Y, Yamamoto M, Kodama M. 2016. The global regulator LaeA controls biosynthesis of host-specific toxins, pathogenicity and development of *Alternaria alternata* pathotypes. *J Gen Plant Pathol* 82:121-131. doi: 10.1007/s10327-016-0656-9.
- Vödösch M, Scherlach K, Winkler R, Hertweck C, Braun HP, Roth M, Haas H, Werner ER, Brakhage AA, Kniemeyer O. 2011. Analysis of the *Aspergillus fumigatus* proteome reveals metabolic changes and the activation of the pseurotin A biosynthesis gene cluster in response to hypoxia. *J Proteome Res* 10:2508e2524. doi: 10.1021/pr1012812.
- Wang R, Leng Y, Shrestha S, Zhong S. 2016. Coordinated and independent functions of velvet-complex genes in fungal development and virulence of the fungal cereal pathogen *Cochliobolus sativus*. *Fungal Biol* 120: 948-960. doi: 10.1016/j.funbio.2016.05.004.
- Wang B, Li X, Tabudravu J, Wang S, Deng H, Pan L. 2021. The chemical profile of activated secondary metabolites by overexpressing LaeA in *Aspergillus niger*. *Microbiol Res* 248:126735. doi: 10.1016/j.micres.2021.126735.
- Wang G, Zhang H, Wang Y, Liu F, Li E, Ma J, Yang B, Zhang C, Li L, Liu Y. 2019. Requirement of LaeA, VeA, and VelB on asexual development, ochratoxin A biosynthesis, and fungal virulence in *Aspergillus ochraceus*. *Front Microbiol* 10:2759. doi: 10.3389/fmicb.2019.02759.
- Wiemann P, Guo C-J, Palmer JM, Sekonyela R, Wang CCC, Keller NP. 2013. Prototype of an intertwined secondary metabolite supercluster. *PNAS* 110:17065-17070. doi: 10.1073/pnas.1313258110.

- Wiemann P, Brown DW, Kleigrewe K, Bok JW, Keller NP, Humpf H-U, Tudzynski B. 2010. FfVel1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect differentiation, secondary metabolism and virulence. *Molecular Microbiology* 77:972-994. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07263.x.
- Wosten H, De Vries O, Wessels J. 1993. Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer. *Plant Cell* 5, 1567-1574.
- Wu D, Oide S, Zhang N, Choi MY, Turgeon BG. 2012. ChLae1 and ChVel1 regulate T-toxin production, virulence, oxidative stress response, and development of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *PLoS Pathog* 8:e1002542. doi: 10.1371/journal.ppat.1002542.
- Yin WB, Baccile, JA, Bok JW, Chen Y, Keller, NP, Schroeder FC. 2013. A nonribosomal peptide synthetase derived iron(III) complex from the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *J Am Chem Soc* 135:2064e2067. doi: 10.1021/ja311145n.
- Yin M, Xiao D, Wang C, Zhang L, Dun B, Yue Q. 2022. The regulation of BbLaeA on the production of beauvericin and bassiatin in *Beauveria bassiana*. *World J Microbiol Biotechnol* 38:1. doi: 10.1007/s11274-021-03162-8.
- Yu J-H, Keller N. 2005. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu Rev Phytopathol* 43:437-458. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.140214.
- Zhang X, Hu Y, Liu G, Liu M, Li Z, Zhao J, Song X, Zhong Y, Qu Y, Wang L, Qin Y. 2022. The complex Tup1-Cyc8 bridges transcription factor ClrB and putative histone methyltransferase LaeA to activate the expression of cellulolytic genes. *Mol Microbiol* 117:1002-1022. doi: 10.1111/mmi.14885.
- Zhang X, Zhu Y, Bao L, Gao L, Yao G, Li Y, Yang Z, Li Z, Zhong Y, Li F, Yin H, Qu Y, Qin Y. 2016. Putative methyltransferase LaeA and transcription factor CreA are necessary

for proper asexual development and controlling secondary metabolic gene cluster expression. *Fungal Genet Biol* 94:32-46. doi: 10.1016/j.fgb.2016.07.004.

Zhgun AA, Nuraeva GK, Eldarov MA. 2019. The role of LaeA and LovE regulators in lovastatin biosynthesis with exogenous polyamines in *Aspergillus terreus*. *Appl Biochem Microbiol* 55, 6:639-648. doi: 10.1134/S0003683819060176.

Zhu C, Wang Y, Hu X, Lei M, Wang M, Zeng J, Li H, Liu Z, Zhou T, Yu D. 2020. Involvement of LaeA in the regulation of conidia production and stress responses in *Penicillium digitatum*. *J Basic Microbiol* 60:82-88. doi: 10.1002/jobm.201900367.

Supporting Information

LaeA, a master gene in the development, pathogenicity, and secondary metabolism of *Penicillium expansum*

Nadia Tahtah, Chrystian Zetina-Serrano, Ophélie Rocher, Claire Naylies, Yannick Lippi, Emilien L. Jamin, Isabelle P. Oswald, Sophie Lorber, Olivier Puel*

Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

*Correspondence: Olivier Puel

olivier.puel@inrae.fr

Tel.: +33 582 066 336

Construction and characterization of the null mutant *PeΔ*laeA** strain

Creation of a linear transformation cassette using double-joint PCR

The role of the *laeA* gene was determined by creating a null mutant *PeΔ*laeA** strain in which the *laeA* gene was eliminated. In the wild type NRRL 35695 (WT) strain of *Penicillium expansum*, the homologous recombination strategy was used to replace the *laeA* coding region with the hygromycin resistance marker, as previously described (Zetina-Serrano et al., 2020). Based on the *P. expansum* strain d1, sequence deposited in GenBank (PEXP_065290), specific primers of the *laeA* gene were designed (Table S4). The Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) was used for all PCR amplifications. To promote homologous recombination at the locus of interest, the 5' upstream and 3' downstream flanking regions served as complementary sequences. PCR was used to amplify the fragments necessary for the construction of the gene disruption marker while double-joint PCR was used to assemble them.

Using the genomic DNA of the WT strain, the 1,024 bp DNA fragment that corresponds to the promoter and the 5' untranslated region of the *laeA* gene was amplified using the primer pair 5fdebLaeAPex / DebLaeAPex1Rhygro, while the 974 bp fragment that corresponds to the 3' untranslated region of the *laeA* gene was amplified using the primer pair FinLaeAPex1Fhygro / 3rfinLaeAPex. The primer pair *laeAhphF1* / *laeAhphR1* was used to amplify a 4,107 bp fragment of pAN 7.1 plasmid (access number Z32698) containing the hygromycin (*hph*) resistance gene.

At the ends of the primers DebVelBPex1Rhygro and FinVelBPex1Fhygro, two sequences, similar to those at the extremities of the PCR product induced by the primer pair *hphF1* / *hphR1*, were added (underlined sequences in Table S4) to allow binding between PCR products.

To allow amplification of the 5' and the 3' junctions, the following PCR program was used: a 45 s denaturation step at 98°C was followed by 40 amplification cycles, consisting for each cycle of a denaturation step of 45 s at 98°C, an annealing step of 45 s at 61°C, and an extension step of 1 min and 15 s at 72°C. The final step of the program consisted of an extension for 10 min at 72°C. For the amplification of the hygromycin resistance marker, a similar PCR program was used with two slight modifications: the annealing temperature was 62°C and the extension cycle lasted 2 min. In order to purify the amplicons, a GenElute™PCR Clean-Up Kit (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used. The protocol used was that described by the manufacturer.

The next step consisted in the assembly of the three fragments generated. To do so, double-joint PCR was used, as previously described by Zetina-Serrano et al. (2020). Briefly, at a ratio of 1:2:1, the three amplicons (flank 5': marker: flank 3') were firstly used in a primerless PCR reaction, thus resulting in the assembly of the flanking regions, the resistance marker, the single-union as well as the double union product. For this purpose, the following program was applied: a first single 5 min denaturation step at 98°C was followed by 12 PCR cycles, a denaturation step of 45 s at 98°C, a 2 min annealing step at 60°C, and a 3 min extension step at 64°C. The final step consisted of an extension for 5 min at 64°C.

In order to amplify the double-union product exclusively, the dLaeA-NestedF / dLaeA-NestedR nested primer pair was used and the following PCR program was applied: a 5 min denaturation step at 98°C was followed by a denaturation step of 45s at 98°C, a 30 s annealing step at 65°C, and a 3 min extension step at 68°C. A temperature gradient was applied: for each cycle, the annealing temperature decreased by 0.5°C until reaching a temperature of 62°C. After that, 24 amplification cycles, consisting each of a denaturation step of 45 s at 98°C, followed by a 30 s annealing step at 62°C, and a 3 min extension step at 68°C were performed. The final step consisted of a 5 min extension at 64°C.

At the end of this PCR, a 6,105 bp fragment containing all three amplicons fused together in the right order was created. Based on the protocol previously described (Snini et al., 2016), this product was used to allow transformation of the protoplasts prepared from the WT strain.

For the creation of the complemented strain, the primer pair dLaeA-NestedF / dLaeA-NestedR was used to generate the genomic DNA fragment that was thereafter used to transform the protoplasts of the null mutant *PeΔlaeA* strain.

SUPPLEMENTARY TABLE 4. Primers used for the construction and the validation of the deletion mutant *PeΔ*laeA** strain.

Primer	Sequence 5' → 3'
5fdebLaeAPex	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGCGAGGTTACCTTG ACTTTACCACTCCG
DebLaeAPex1Rhygro¹	GAGCCTGTGTGTAGAGATACAAGGGAATTC <u>CGCAAGATATCTG</u> <u>AGGCGGTTGTGAACC</u>
FinLaeAPex1Fhygro¹	GTGTAAGCGCCCACTCCACATCTCCA <u>CTCGGCTGGTGAATCCT</u> <u>CCAGGGCTAC</u>
3rfinLaeAPex	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGTCCATGGGGTAC TATATTCAATAGGGC
laeAhphF1	GAATTCCTTGTATCTCTACACACAGGCTC
laeAhphR1	CGAGTGGAGATGTGGAGTGGGCG
dLaeA-NestedF	GGTCCACGTCGATCTAGCTCTTACG
dLaeA-NestedR	CTCAGCAAATGCATTAACCTTGGAAGGC
dlaeA-geneF	GATTCCAGGATGCGACACCTGCC
dlaeA-geneR	GATGTGCAGAAGGTTGTATGTTTTGATCTTTTTGTCA
Hyg5'1 R	CTTGACACCGCTCCGTCCTCC
Hyg3'1 F	GGGTTTACCTCTTCCAGATACAGCTC
dLaeA-5'F	GCGAGTGGAAATCCCTGGAAACGAG
dLaeA -3'R	GCAAGATCCAATGAAACCTGCTATCAGG
GWlaeA 5'1²	CCAGAGCACCGGTTGAAGAAGCTAAACC
GWlaeA 5'2²	AGGACTGGTTCTTAATCCTGGTAATCTGGG
GWlaeA 3'1²	CCAGATTACCTTCTATAGTTTCTGACACTTCC
GWlaeA 3'2²	GCTACCCGAATGACGAGTCGATATGTCTC
LaeA_F1³	CTCCGATTATAATTTCCGATCGCAAGATAC
LaeA_R1³	GTGAACAGTTTGTGTGGAATATGTGCGAGAC
Pexp_btub Forward³	TGAACGTCTACTTCAACCATGCC
Pexp_btub Reverse³	CCAAATCGACGAGAACGG

¹The underlined sequences added to the 5' and 3' ends were identical to the ends of the PCR product generated by the hphF1/hphR1 primers.

²Primers used for genome walking validation.

³Primers used in qPCR validation.

Validation of the Null Mutant *PeΔvelB* strain

Polymerase chain reaction (PCR) and genome walking

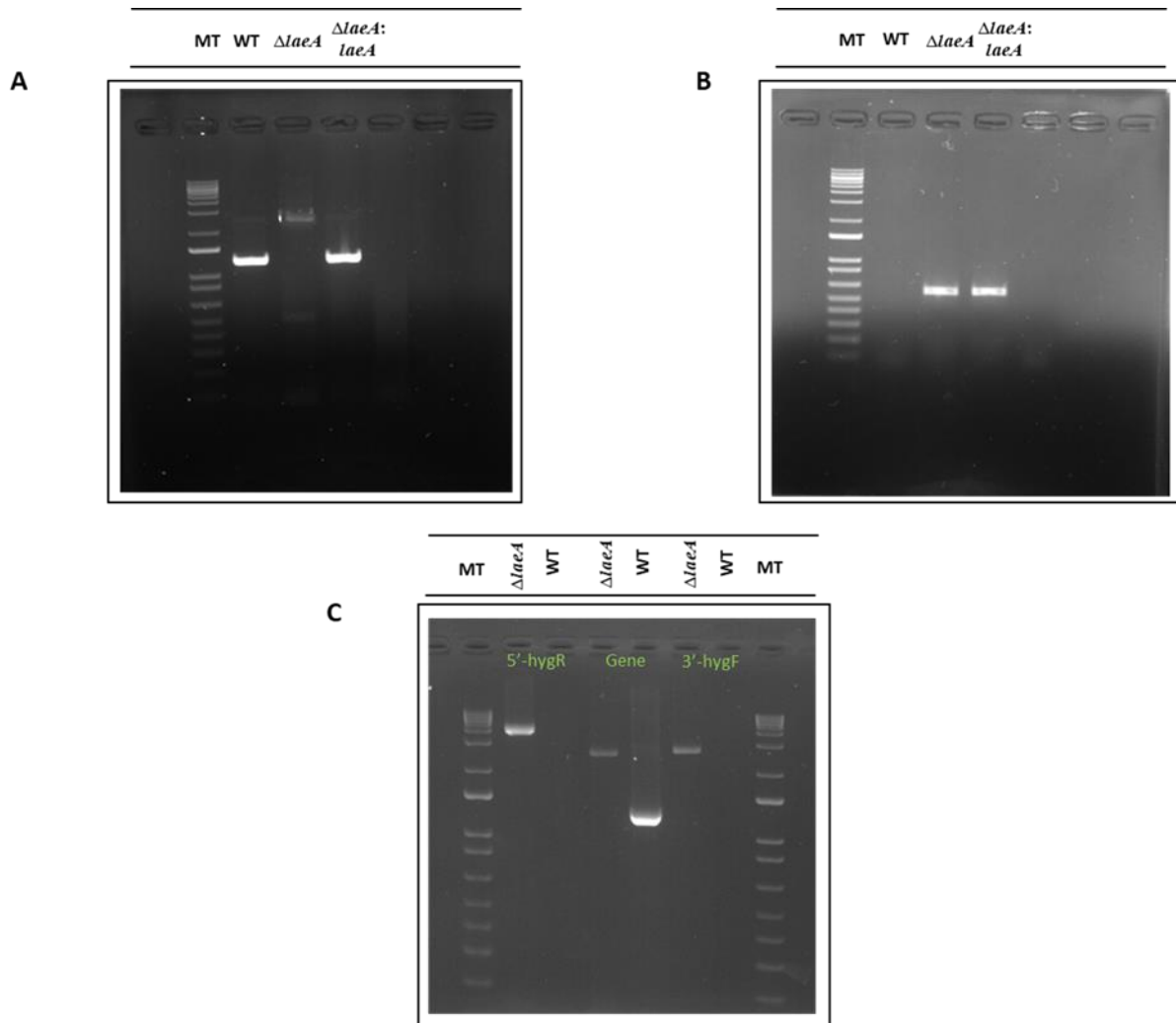
In order to verify the replacement of the *laeA* gene by the hygromycin resistance marker at the locus of interest, a PCR reaction was first performed to confirm the insertion of the deletion cassette. As a first step, genomic DNA was extracted and then used to detect the absence of the *laeA* gene by PCR screening (Moore et al., 2018). For that, the specific primer pair *dlaeA-geneF* / *dlaeA-geneR* was used and the following PCR program was applied: 35 cycles consisting of a denaturation step of 45 s at 98°C, a 45 s annealing step at 62°C, an extension step of 1 min and 30 s at 72°C. A final extension step of 10 min at 72°C was performed. This PCR was realized in order to select the null mutants. PCR generated a fragment of 1,109 base pairs (bp) for the WT strain and no fragment for the null mutant *PeΔlaeA* strain (Figure S13A). PCR generated a fragment of 584 bp for the null mutant *PeΔlaeA* strain and no fragment for the WT strain using the *hygF* and *hygR* primers, specific to the hygromycin sequence (Figure S13B). The PCR conditions were previously described by Snini et al., (2016). To check that the deletion cassette was inserted at the locus of interest, the next step consisted in a PCR amplification conducted on the hereby selected transformants, and using the hygromycin specific primer pair *dLaeA-5'F* / *Hyg5'1R* located at the 5' upstream and 3' downstream junctions of the disruption cassette and *Hyg3'1F*/ *dLaeA-3'R*, located inside the hygromycin marker. The PCR conditions used were as follows: 35 cycles consisting each of a denaturation step of 45 s at 98°C, a 45 s annealing step at 62°C, and a 2 min extension at 72°C; a final extension step of 10 min at 72°C was performed. For the two PCR reactions described above, the Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) and the Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) were respectively used. The replacement of *laeA* by *hph* was confirmed by the amplification of the 5' and 3' locus *laeA/hph* junctions in the *PeΔlaeA* strain that generated fragments of bp and bp (Figure S13C).

After this first verification by PCR, a verification by genome walking (GenomeWalker Universal Kit, Takara Bio Europe SAS, Saint-Germain-en-Laye, France) was performed. This method consists in using a known genomic DNA sequence to identify unknown adjacent sequences. It is applied to validate the single insertion of the cassette at the *laeA* locus of *P. expansum*. The protocol used was that recommended by the manufacturer. As a first step, the restriction enzyme *PvuII* was used to digest aliquots of 2.5 µg of genomic DNA, overnight. After that, the digested genomic DNA was ligated to the GenomeWalker adaptors. This step allows the construction of so-called 'libraries' that correspond to uncloned genomic DNA fragments ligated to adaptors.

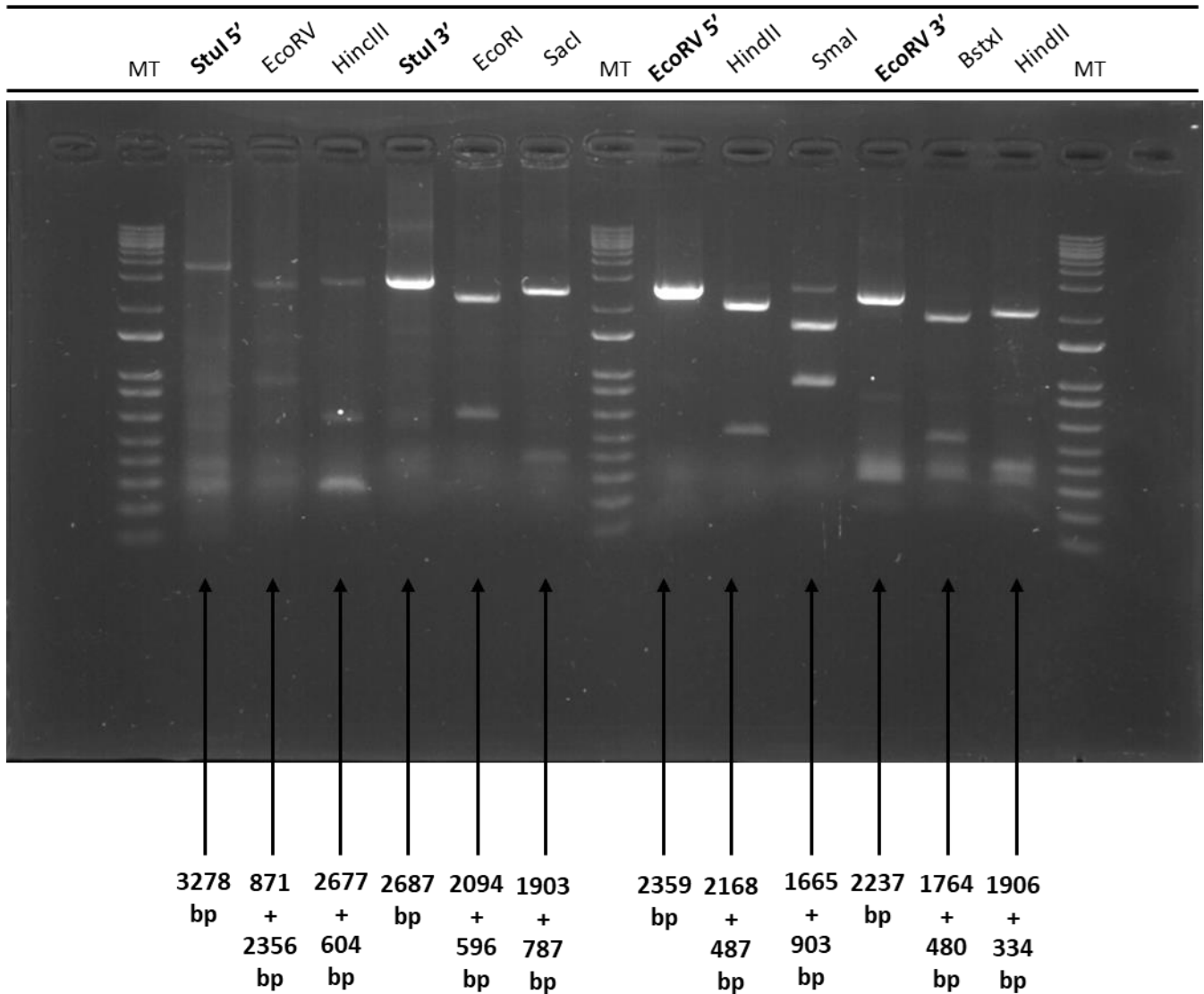
Once the libraries constructed, two PCR amplifications were carried out. A primary PCR, using AP1, the kit's adaptor primer as well as *GWVelB5'1* and *GWVelB3'1*, two external gene-specific primers designed respectively from the 5' and the 3' end sequences of the disruption cassette. The PCR program used was divided into two cycles as follows: the first cycle, repeated seven times, consisted in a denaturation phase of 25 s at 94°C followed by a 3 min annealing/extension step at 72°C, whilst the second cycle, repeated 32 times, consisted in a denaturation phase of 25 s at 94°C and a 3 min extension step at 67°C followed by a final 7 min incubation phase at 67°C. This primary PCR resulted in an amplicon that was used as a template for the secondary (nested) PCR, after being diluted (1:50). The primers used in this nested PCR were AP2, the nested adaptor primer as well as *GWVelB5'2* and *GWVelB3'2*. Similarly to the primary PCR, the PCR program was divided into two cycles, repeated five and 20 times respectively, as follows: the first cycle consisted in a denaturation phase of 25 s at

94°C followed by a 3 min annealing/extension step at 72°C, whilst the second cycle consisted in a denaturation phase of 25 s at 94°C and a 3 min extension step at 67°C followed by a final 7 min incubation phase at 67°C. The Advantage 2 Polymerase Mix (Takara Bio Europe SAS) was put to use for the realization of the PCR amplifications. All primer sequences are presented in Table S5. The PvuII 5' library generated only one amplicon of 1 350 bp, while the PvuII 3' library generated only one amplicon of 350 bp. The fragments were checked by (i) restriction cutting according to the restriction map generated from the d1 strain DNA genomic sequence deposited in GenBank (IQFY01000048.1) and (ii) sequencing. The PCR products obtained from the PvuII5' and PvuII3' libraries were cut by DraII and ApoI respectively. DraII produced fragments of 945, 240, 206 from PvuII5' PCR product. The restriction enzyme ApoI was used for the PCR product obtained from the PvuII3' fragment and produced fragments of 232, 106 bp (Figure S14).

The GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Merck KGaA) was used to purify the fragments obtained by the nested PCR in order to perform two sequencing reactions by the Microsynth sequencing laboratory (Vaulx-en-Velin, France), using the primers AP2 and GSP2.



SUPPLEMENTARY FIGURE 13. Validation of deletion and complementation by PCR analyses of genomic DNA of *Penicillium expansum* wild-type NRRL 35695 (WT), null mutant $Pe\Delta laeA$, and complemented $Pe\Delta laeA: laeA$ strains. a) PCR amplification of the *laeA* gene from genomic DNA of the wild type NRRL 35695 (WT), null mutant $Pe\Delta laeA$ and complemented $Pe\Delta laeA: laeA$ strains using the primer pair dLaeA-geneF / dLaeA-geneR. The size of the fragment amplified from the genomic DNA of the WT and complemented strains is 1,343 bp. Results showed the absence of the *laeA* gene in the null mutant strain. b) PCR amplification using the primer pair hygF/hygR that showed the incorporation of the hygromycin cassette in the genome of the null mutant $Pe\Delta laeA$ strain with a predicted 584 kb PCR product and the absence of amplification in the wild type strain. c) Primers, lane 1 and 2: dLaeA-5'F / Hyg5'1 R, lane 3 and 4: dLaeA-geneF / dLaeA-geneR and lane 5 and 6: Hyg3'1 F / dVeiB -3'R. The presence of the disruption cassette $\Delta laeA$ at the *laeA* locus was confirmed in the null mutant strain that amplified fragments of 3949 bp and 2635 bp. No amplification was observed in the wild type for PCR with the primer pairs dLaeA-5'F / Hyg5'1 R and Hyg3'1 F / dLaeA -3'R. In addition, the presence of the *laeA* gene was not detected in the null mutant strain, while the WT strain produced an amplicon of 1,343 bp. MT Lane: 1 kb plus DNA ladder.



SUPPLEMENTARY FIGURE 14. Genome walking (GW) analyses of genomic DNA of *Penicillium expansum* wild type NRRL 35695 and null mutant *PeΔlaeA* strains. (A) Lane 1: PCR product with the primers AP2-GWLaeA5'2 from the PvuII (1,350 bp) library. Lane 2: Enzymatic digestion of the PvuII5' library amplicon with the enzyme DraII (945, 240, 206 bp). (B) Lane 1: PCR product with the primers AP2-GWLaeA3'2 from the PvuII (350 bp) library. Lane 2: Enzymatic digestion of the PvuII3' library amplicon with the enzyme ApoI (232 and 106 bp). MT Lane: 1 kb plus DNA ladder.

Quantitative real-time PCR Validation

A qPCR analysis was carried out with the aim of investigating each transformant strain's gene expression. For that purpose, a pre-culture of the WT, null mutant *PeΔlaeA*, and complemented *PeΔlaeA: laeA* strains was realized on MEA medium. A spore suspension of each strain was then prepared at a concentration of 10^6 conidia/mL, of which 10 μ L were used to inoculate Petri dishes containing MEA medium and covered with a sterile cellophane layer. After an incubation period of 5 days at 25°C and in the dark, total RNA was isolated.

For that, 110-120 mg of mycelium from each strain, was separated from the cellophane layer, weighed and then transferred to lysing matrix D tubes (1.4 mm ceramic spheres, Thermo Fisher Scientific). Then, 760 μ L of lysis buffer (750 μ L of RLT buffer (Rneasy mini kit, QIAGEN, Courtaboeuf, France) in addition to 10 μ L of β -mercaptoethanol (Merck KGaA)) were added to the mycelium and the tubes were directly placed in liquid nitrogen. A Precellys homogenizer (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) was used to allow homogenization of the mycelium cells. Three grindings were applied: a first one at 6,500 rpm for 15s, a second one at 6,500 rpm for 25s, and a third one at 6,500 rpm for 15s. After each grinding program, the samples were placed 5 min on ice. The next step consisted in a centrifugation at 16,000 g at 4°C for 10 min after which the supernatants were extracted and placed in QIAshredder spin columns (QIAGEN) and treated as previously described (Tannous et al., 2014b). Once the total RNA extracted, it was purified using gDNA-eliminator minicolumns (QIAGEN). RNA quality and concentration were respectfully assayed by gel electrophoresis (1.2% agarose) and by a NanoDrop ND1000 (Labtech, Palaiseau, France). The final RNA concentrations were around 292-335 ng/ μ L ($A_{260/280}$ = 2.08), 285-457 ng/ μ L ($A_{260/280}$ = 1.98) and 746-1012 ng/ μ L ($A_{260/280}$ = 2.2) for the WT, null mutant *PeΔlaeA* and complemented *PeΔlaeA: laeA* strains respectively.

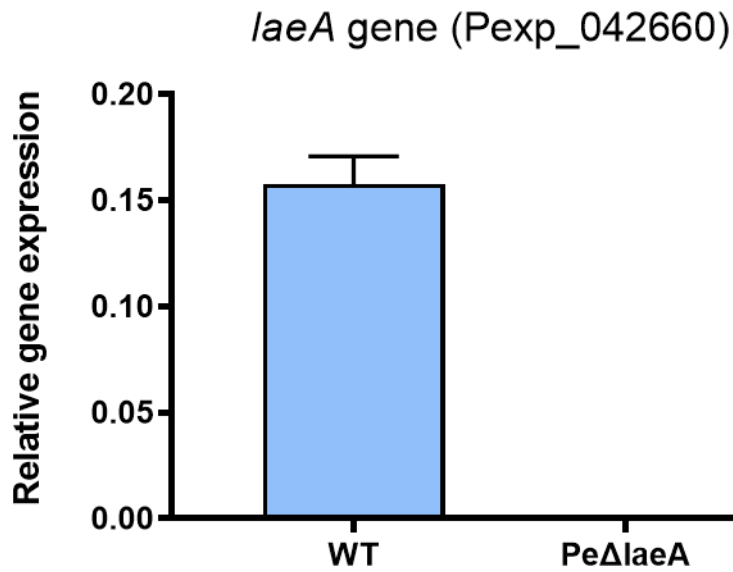
According to the protocol previously detailed (Caceres et al., 2016), the reverse transcription was realized using 10 μ L of RNA at a concentration of 153 ng/ μ L with 1 μ L of oligo (dT) Bys 3' Primer: (5'-GCTGTCAACGATACGCTATAACGGCATGACAGTGT TTTTTTTT-3').

To perform the qPCR experiment, a three-step cycling was applied with a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). To amplify 50-100 bp of the *velB* gene, the primer pair *LaeA_F* / *LaeA_R* was used. The reference gene used in this experiment was the *benA* gene (coding for β -tubulin). Design and validation of the primers was realized as previously described (Caceres et al., 2016) (sequences in Table S5 of this Supporting Information).

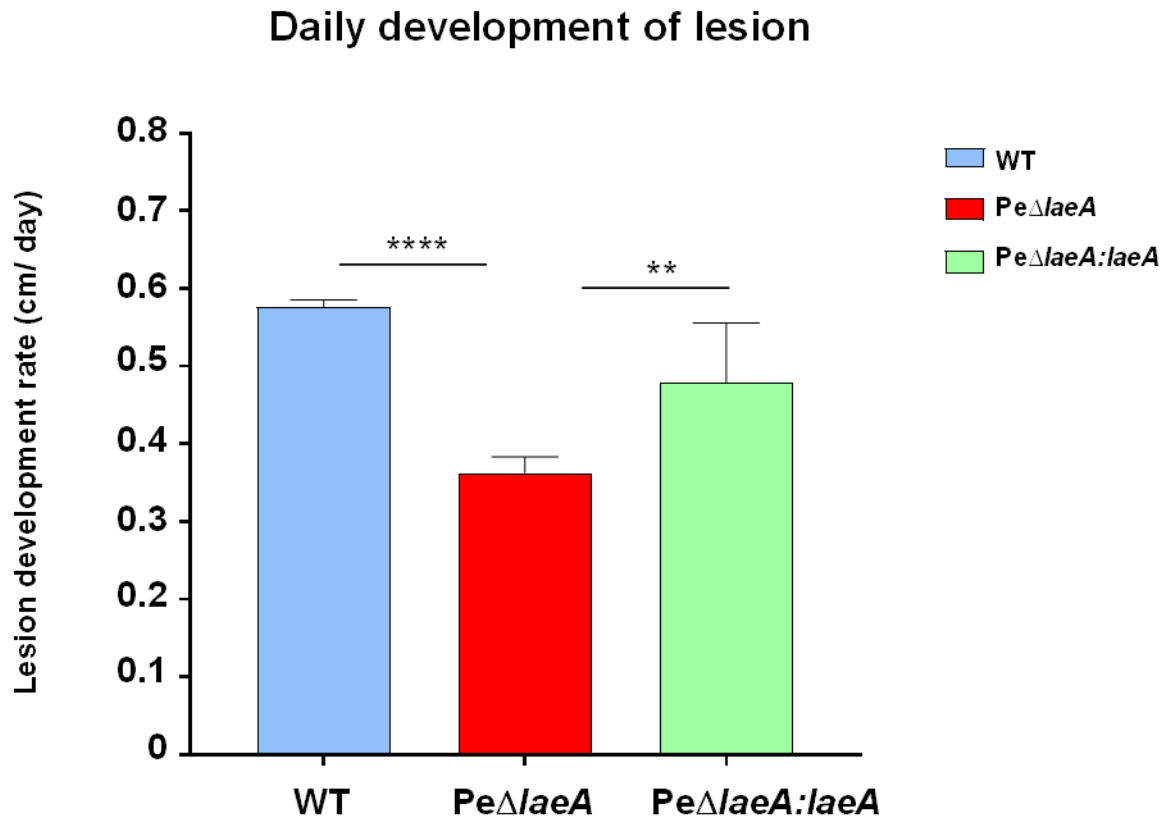
For PCR amplification, 5 μ L of DNA template, 12.5 μ L of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), and 7.5 μ L of primer mix (300 nM for the reference *benA* gene and 300 nM for the *laeA* F/R primers) were used.

The program applied was as follows: a 10 min denaturation phase at 95°C was followed by 40 cycles, consisting of a denaturation step of 15 s at 95°C and a 1 min annealing phase at 60°C. A final extending step of 15 s at 95°C, 1 min at 60°C, 15 s at 95°C and 15 s at 60°C was performed for analysis of melt curves. Results were analyzed using the 7300 System SDS Software (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific).

The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, described by Livak and Schmittgen, (2001), was applied to analyze changes in gene expression. Statistical analysis consisted in using the Student's t-test with the GraphPad 4 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Changes were considered to be statistically significant for a p-value < 0.05. All experiments were performed using four biological replicates for each strain.



SUPPLEMENTARY FIGURE 15. Validation of the mutant by quantitative real-time PCR analysis. The expression of the *laeA* gene was assessed in *Penicillium expansum* wild type NRRL 35695 and in the null mutant Pe Δ *laeA* strains. GraphPad 4 Software was used for statistical analysis and a Student's t-test was realized. The graph shows the mean \pm standard error of the mean (SEM) using four biological replicates. **** p-value <0.0001.



SUPPLEMENTARY FIGURE 16. Rot growth rates obtained from Golden Delicious apples infected with *Penicillium expansum* wild type NRRL 35695, the null mutant Pe Δ laeA, and the complemented Pe Δ laeA:laeA strains. Apples were stored for 14 days at 25°C in the dark. The graph shows the mean \pm standard error of the mean (SEM) from nine biological replicates. ** p-value < 0.01 **** p-value < 0.0001.

SUPPLEMENTARY TABLE 5. Fourteen orthologous genes similarly regulated to *wetA* in *Penicillium expansum* Δ *brlA* and *P. rubens* Δ *brlA*.

Penicillium expansum strain d1 Gene ID	Log ₂ fold change <i>Pe</i> Δ <i>laeA</i> vs WT	Adjusted p-value
PEXP_022650	-1.33	3.83 x 10 ⁻¹⁰
PEXP_041930	-2.73	7.43 x 10 ⁻¹³
PEXP_056810	-1.03	3.09 x 10 ⁻⁸
PEXP_084350	-1.29	4.29 x 10 ⁻¹⁰
PEXP_096560	-1.96	4.67 x 10 ⁻¹⁰
PEXP_096550	-1.98	2.20 x 10 ⁻⁹
PEXP_037140	-2.00	6.03 x 10 ⁻¹¹
PEXP_096630	-1.44	1.39 x 10 ⁻⁹
PEXP_097170	-1.95	1.60 x 10 ⁻¹²
PEXP_097180	-2.15	2.19 x 10 ⁻¹³
PEXP_097190	-2.62	4.14 x 10 ⁻¹⁴
PEXP_077410	-1.05	6.25 x 10 ⁻⁹
PEXP_091180	-1.23	2.21 x 10 ⁻⁸
PEXP_018490	-0.838	3.22 x 10 ⁻⁸

Chapitre 3

Résultats complémentaires : Analyse transcriptomique du mutant nul $Pe\Delta veA$

INTRODUCTION

Penicillium expansum est un des champignons filamenteux très étudiés car il constitue l'agent causal de la maladie de pourriture bleue et le principal producteur de patuline dans les pommes. En plus cette dernière et de nombreuses autres mycotoxines, ce champignon pathogène produit également la citrinine. Ces deux mycotoxines sont impliquées dans la pathogénicité et la virulence de *P. expansum*.

Chez les champignons filamenteux, le métabolisme secondaire est associé au développement fongique, qui dépend lui-même de nombreux facteurs biotiques et abiotiques externes. Le facteur de transcription global VeA joue un rôle primordial dans la coordination du métabolisme secondaire et de nombreux processus de différenciation chez plusieurs espèces fongiques. Pour analyser le rôle de VeA dans la régulation du métabolisme secondaire et du développement, une analyse transcriptomique a été effectuée sur une souche mutante *PeΔveA* générée antérieurement à la thèse. Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression des gènes impliqués dans les clusters de la biosynthèse de la patuline, de la citrinine et de la chaétoglobosine A, trois mycotoxines dont la production a été fortement impactée par la délétion du gène *veA*. Dans un second temps, nous avons comparé l'expression de gènes différentiellement exprimés (DEG) impliqués dans des clusters de la biosynthèse d'autres métabolites secondaires, ainsi que des DEG impliqués dans divers processus physiologiques chez la souche sauvage (WT) et la souche mutante *PeΔveA*.

MATERIELS ET METHODES

1.1. Souches, milieux et conditions et conditions de culture

La souche sauvage (WT) NRRL 35695 de *P. expansum* a été également utilisée dans cette étude. Cette souche a été isolée de baies de raisins trouvés dans la région Occitanie (France).

1.2. Construction et validation de la souche $Pe\Delta veA$

Une souche mutante $Pe\Delta veA$ a été générée précédemment à partir de la souche sauvage (El Hajj Assaf et al., 2018). La construction et la validation ont été faite comme déjà décrit (El Hajj Assaf et al., 2018).

1.3. Analyse transcriptomique par biopuce

L'ARN total des souches sauvage et déficiente $Pe\Delta veA$ a été extrait et les profils d'expression génétiques ont été évalués comme déjà décrit par Zetina-Serrano et al. (2020) et dans les chapitres 1 et 2. Quatre réplicats biologiques de chaque souche ont été utilisés pour effectuer les analyses d'expression génétique.

1.4. Analyse statistique

Pour analyser les différences d'expression entre les souches WT et mutante nulle ($Pe\Delta veA$), un test de Student ainsi qu'une analyse de la variance (ANOVA) ont été utilisés. Pour une valeur- $p \leq 0,05$, les différences ont été considérées comme statistiquement significatives. Le logiciel GraphPad Prism 4 (San Diego, CA, USA) a été utilisé pour effectuer toutes les analyses statistiques des données de cette étude.

RESULTATS

Analyse transcriptomique du mutant *PeΔveA*

Pour évaluer l'effet de la délétion de *veA* sur l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme secondaire, une analyse de microarray a été réalisée sur les souches sauvage (WT) et *PeΔveA* après une durée d'incubation de 5 jours sur milieu gélosé à base d'extrait de malt (MEA). Les gènes sont considérés significativement différentiellement exprimés lorsque le \log_2 fold change (\log_2FC) est <-1 ou >1 avec une valeur- $p < 0,05$. En comparaison de la souche WT, la souche *PeΔveA* a montré 1 079 gènes différentiellement exprimés (DEG), parmi lesquels 316 et 763 gènes sont significativement sur-régulés et sous-régulés, respectivement.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la patuline, la citrinine et la chaétoglobosine A chez la souche WT et la souche mutante *PeΔveA* (Figure 31).

Pour le cluster de la patuline (Figure 31A), les résultats ont montré que 14 des 15 gènes impliqués dans la biosynthèse de cette mycotoxine ont été significativement sous-régulés chez la souche mutante *PeΔveA*, en comparaison de la souche WT. Le seul gène qui a un \log_2FC supérieur à -1 est le gène *patL* (PEXP_094430, $\log_2FC = -0,50$), codant pour le facteur de transcription (FT) spécifique du cluster, PatL. Les gènes de ce cluster les plus sous-régulés chez la souche mutante sont : *patO* (PEXP_094420, $\log_2FC = -4,4$), *patJ* (PEXP_094450, $\log_2FC = -3,88$), *patI* (PEXP_094440, $\log_2FC = -3,56$), *patK* (PEXP_094460, $\log_2FC = -3,44$), *patA* (PEXP_094390, $\log_2FC = -3,27$), et *patM* (PEXP_094400, $\log_2FC = -3,21$) (Figure 31A).

Pour le cluster de la citrinine (Figure 31B) comme pour celui de la patuline, les résultats ont révélé une sous-régulation significative de 9 des 10 gènes impliqués dans la biosynthèse de cette mycotoxine chez la souche *PeΔveA*. C'est uniquement le gène *ctnA* (PEXP_005550), codant pour le FT spécifique du cluster, qui n'a pas montré une sous-régulation significative ($\log_2FC = -0,51$). Au sein de ce cluster, *citB* (PEXP_005540, $\log_2FC = -8,16$), *citS* (PEXP_005520, $\log_2FC = -7,96$), *citD* (PEXP_005560, $\log_2FC = -7,41$), *orf5* (PEXP_005510,

$\log_2FC = -6,96$), et *citA* (PEXP_005530, $\log_2FC = -6,43$) sont les gènes les plus sous-régulés chez la souche mutante (Figure 31B).

Pour le cluster de la chaétoglobosine A (Figure 31C), la totalité des gènes qui en font partie sont significativement sous-régulés chez la souche mutante *PeΔveA*. Les gènes les plus fortement sous-régulés au sein de ce cluster sont PEXP_073970 ($\log_2FC = -4,07$), PEXP_074000 ($\log_2FC = -3,75$), PEXP_073990 ($\log_2FC = -3,53$), PEXP_074050 ($\log_2FC = -3,39$) et PEXP_073960 ($\log_2FC = -3,20$) (Figure 31C).

Nous avons ensuite comparé l'expression d'autres gènes impliqués dans le métabolisme secondaire de *P. expansum*, incluant des polykétides synthases (PKS), des synthétases de peptides non ribosomiaux (NRPS), et des diméthylallyl tryptophane synthétases (DMATS) chez la souche WT et la souche *PeΔveA* (Figure 32). Dix-neuf gènes ont montré une différence significative dans l'expression chez le mutant nul *PeΔveA*, en comparaison de la souche WT (Figure 32). Plus spécifiquement, 8 gènes, PEXP_094770 ($\log_2FC = 7,27$), PEXP_000410 ($\log_2FC = 7,06$), PEXP_043150 ($\log_2FC = 4,31$), PEXP_094810 ($\log_2FC = 4,03$), PEXP_076200 ($\log_2FC = 3,36$), PEXP_040330 ($\log_2FC = 2,00$), PEXP_086670 ($\log_2FC = 1,21$), et PEXP_079130 ($\log_2FC = 1,01$) sont significativement sur-régulés chez la souche *PeΔveA* (Figure 32).

Inversement, 10 gènes, PEXP_030140 ($\log_2FC = -2,03$), PEXP_024160 ($\log_2FC = -1,89$), PEXP_018230 ($\log_2FC = -1,37$), PEXP_074230, codan pour la bicyclogermacrène synthase, ($\log_2FC = -1,30$), PEXP_095510 ($\log_2FC = -1,30$), PEXP_096300 ($\log_2FC = -1,28$), PEXP_030090 ($\log_2FC = -1,27$), PEXP_093300 ($\log_2FC = -1,22$), PEXP_102410 ($\log_2FC = -1,12$), et PEXP_095540 ($\log_2FC = -1,06$) sont significativement sous-régulés chez la souche *PeΔveA* (Figure 32).

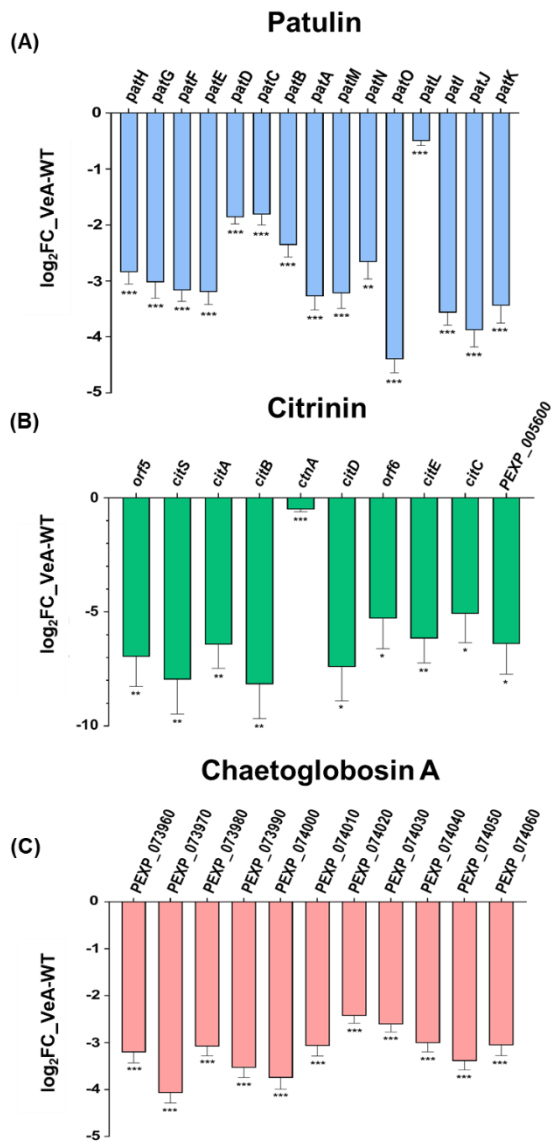


Figure 31. Log₂ fold change (log₂FC) de l'expression des gènes appartenant aux clusters impliqués dans la biosynthèse de la patuline, de la citrinine et de la chaétoglobosine A chez les souches WT et PeΔveA. A) Cluster de la patuline (PEXP_094320-PEXP_094460). B) Cluster de la citrinine (PEXP_005510-PEXP_005600). C) Cluster de la chaétoglobosine (PEXP_073960-PEXP_074060). Les souches ont été cultivées pendant 5 jours à 25 °C dans l'obscurité sur un milieu gélosé à base d'extrait de malt. Les graphiques montrent l'erreur standard moyenne de la moyenne (SEM) de quatre réplicats. Les astérisques indiquent les différences significatives entre les souches WT et PeΔveA. *valeur-p < 0,05 ; **valeur-p < 0,01 ; ***valeur-p < 0,001.

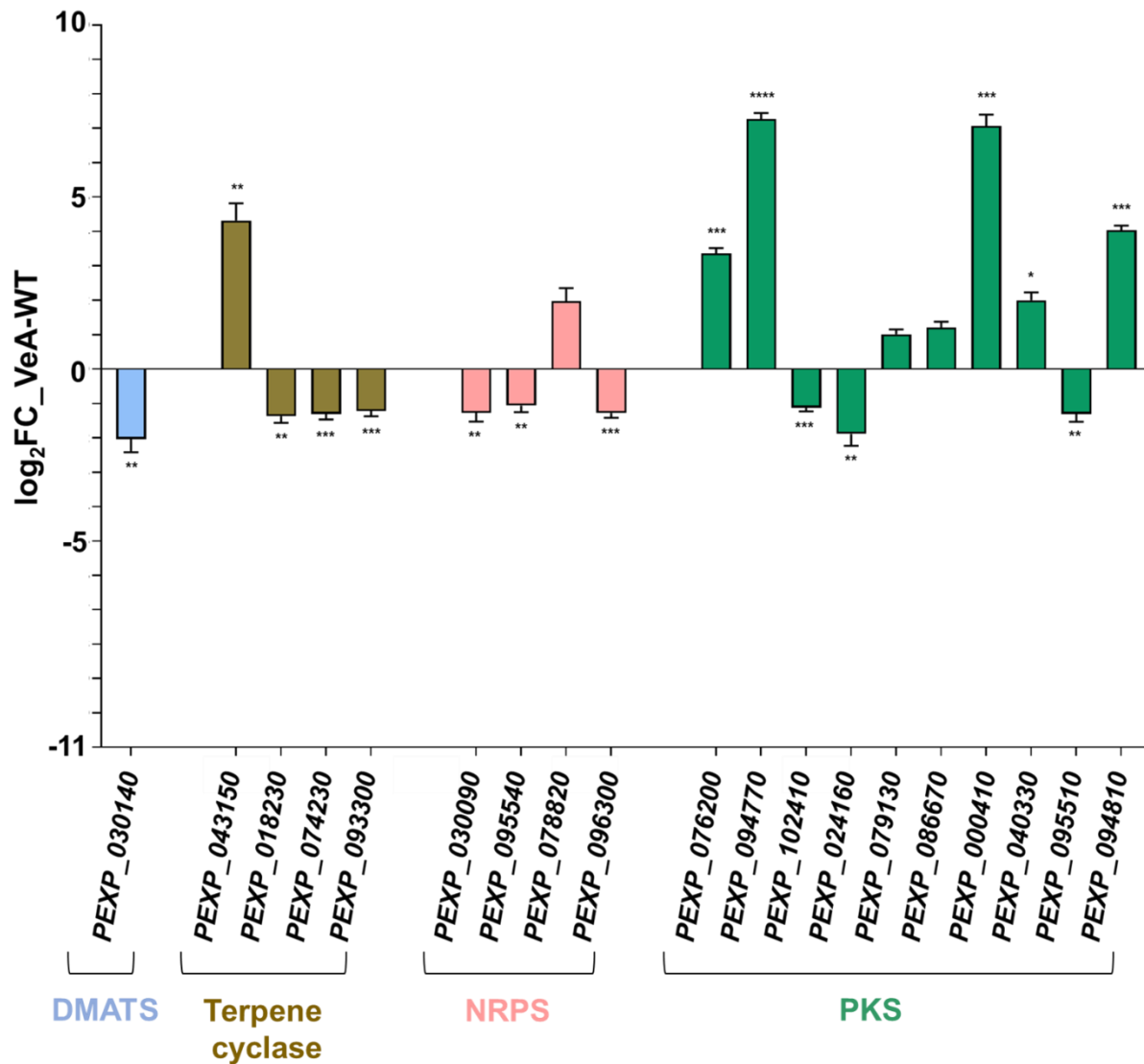


Figure 32. Expression relative de 17 gènes codant pour d'autres enzymes 'backbone' (diméthylallyl tryptophane synthases (DMATS), terpène cyclases, synthétases de peptides non ribosomiques (NRPS), NRPS-like, polykétide synthases (PKS)) identifiés dans le génome de la souche *Penicillium expansum* d1. Les graphiques montrent l'erreur standard moyenne de la moyenne (SEM) de quatre réplicats. Les astérisques indiquent les différences significatives entre la souche sauvage (WT) et la souche *PeveA*. *valeur-p < 0,05 ; **valeur-p < 0,01 ; ***valeur-p < 0,001 ; ****valeur-p < 0,0001

Nous nous sommes également intéressés à des DEG en dehors du métabolisme spécialisé. PEXP_078820 ($\log_2FC = 1,97$), qui code pour SidE, responsable de la synthèse de la fumarylalanine et PEXP_023020 ($\log_2FC = 1,43$), qui code pour MirB, un transporteur impliqué dans le processus de la biosynthèse des sidérophores, sont sur-régulés chez la souche mutante *Pe Δ veA* (Tableau 9).

La délétion du gène *veA* a engendré la surexpression de 3 gènes, PEXP_067550 ($\log_2FC = 1,96$), PEXP_067560 ($\log_2FC = 1,09$) et PEXP_067570 ($\log_2FC = 2,49$), qui codent respectivement pour les protéines NiaD, NiiA et CrnA, impliquées dans l'assimilation du nitrate (Tableau 9).

PEXP_027370 ($\log_2FC = 1,28$), PEXP_103680 ($\log_2FC = 1,07$), PEXP_097970 ($\log_2FC = 1,14$) et PEXP_062960 ($\log_2FC = 1,59$), qui codent pour 4 protéines impliquées dans la biosynthèse de l'ergostérol, Erg11A, Erg25a, Erg2 et Erg3, respectivement, sont significativement surexprimés chez la souche mutante *Pe Δ veA* (Tableau 9).

Table 9. Gènes différentiellement exprimés (DEG) impliqués dans le développement fongique, la conidiation, la biosynthèse des sidérophores, l'assimilation des nitrates et la biosynthèse de l'ergostérol chez la souche mutante nulle *Pe*Δ*veA*.

	<i>Penicillium expansum</i> Souche d1 gene ID	Protéine	Log ₂ fold change <i>Pe</i> Δ <i>veA</i> vs. WT	valeur-p ajustée	Rôle possible
Régulation du développement	PEXP_040110	PhiA	1,48	2,28 x 10 ⁻⁷	Protéine de développement des phialides
	PEXP_050580	PpoC	-1,02	1,12 x 10 ⁻⁷	Oxygénase productrice de psi
Hydrophobines	PEXP_071760	DewC	-2,74	1,51 x 10 ⁻⁸	-
Pigmentation					
Pigment 'DHN-mélanine like'	PEXP_097190	Ayg1	-1,10	7,45 x 10 ⁻⁸	-
Biosynthèse des sidérophores	PEXP_078820	SidE	1,97	9,75 x 10 ⁻⁵	Synthétase de la fumaryl-L-alanine
	PEXP_023020	MirB	1,43	2,10 x 10 ⁻⁵	Sidérochrome transporteur MirB
Assimilation du nitrate	PEXP_067550	NiaD	1,96	2,55 x 10 ⁻³	Nitrate réductase
	PEXP_067560	NiiA	1,09	1,55 x 10 ⁻²	Nitrite réductase
	PEXP_067570	CrnA	2,49	1,99 x 10 ⁻³	Transporteur de nitrate
Biosynthèse de l'ergostérol	PEXP_027370	Erg11A	1.28	2.56 x 10 ⁻⁶	Stérol 14-alpha déméthylase
	PEXP_103680	Erg25a	1.07	7.63 x 10 ⁻⁶	Stérol C4-méthyl oxydase
	PEXP_097970	Erg2	1.14	7.99 x 10 ⁻⁷	Stérol C-8 isomérase
	PEXP_062960	Erg3	1.59	1.05 x 10 ⁻⁶	Stérol delta 5-6 désaturase

DISCUSSION

VeA est un facteur de transcription global qui joue un rôle essentiel dans la régulation positive ou négative de nombreuses voies de biosynthèse de métabolites secondaires chez les champignons filamenteux. VeA a été largement étudié et son rôle de régulateur global a été prouvé chez diverses espèces fongiques. Au sein du genre *Aspergillus*, le rôle de VeA dans la régulation positive des gènes impliqués dans la biosynthèse de la stérigmatocystine et des aflatoxines a été démontré, respectivement chez *Aspergillus nidulans* (Bayram et Braus, 2011; Calvo, 2008; Rauscher et al., 2016) et *A. flavus* (Cary et al., 2015). Chez *A. fumigatus*, VeA est impliqué dans la régulation positive de la production de gliotoxine, fumigaclavine C et fumagilline (Dhingra et al., 2013). Chez les espèces appartenant au genre *Fusarium*, les orthologues de *veA* sont essentiels pour la synthèse de fumonisines et de fusarines chez *Fusarium verticillioides* (Myung et al., 2012) ainsi que la synthèse de trichothécènes chez *F. graminearum* (Merhej et al., 2012). Chez les espèces appartenant au genre *Penicillium*, VeA active la production de pénicilline chez *P. chrysogenum* (Kopke et al., 2013a) et inhibe la synthèse de ML-236B (compactine) chez *P. citrinum* (Baba et al., 2012). Il a été montré que la délétion de *veA* chez *P. expansum* engendre une forte baisse dans l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la patuline, la citrinine ainsi que de nombreux gènes intervenant dans le métabolisme secondaire de ce champignon pathogène (El Hajj Assaf et al., 2018). Cependant, dans cette étude, l'expression relative des gènes a été évalué par RT-qPCR. Le but de l'analyse transcriptomique du mutant \square_{veA} par le biais d'une biopuce nous permettra ultérieurement lors de la discussion générale de comparer la régulation commune exercée par le complexe velvet sur le métabolisme primaire, le métabolisme spécialisé et les fonctions physiologiques essentielles du développement fongique.

Nous avons validé l'intervention de VeA dans la régulation positive des gènes impliqués dans la biosynthèse de la patuline, la citrinine et la chaétoglobosine A, puisque l'ensemble des gènes constituant les clusters de chacune de ces mycotoxines sont sous-exprimés chez le mutant

nul *PeΔveA*, en comparaison de la souche WT. Le rôle de *LaeA* dans la régulation positive de la patuline et de la citrinine a déjà été démontré chez *P. expansum* (Kumar et al., 2016) (chapitre précédent). *PEXP_074060* est un gène qui code pour une protéine qui intervient dans la première étape de la voie de biosynthèse de la chaétoglobosine A ; la délétion de *veA* a engendré une forte sous-expression de ce gène chez le mutant *PeΔveA* ($\log_2FC = -3,057$). Une telle sous-expression a été déjà observée dans le mutant *veA* créé par El Hajj Assaf et al. (2018) ainsi que chez le mutant *PeΔlaeA* créé par Kumar et al. (2016). De notre côté, nous avons également montré l'implication de *VelB* et *LaeA* dans le contrôle positif de ces deux mycotoxines chez *P. expansum* (chapitre 1 et 2). Ces résultats renforcent l'hypothèse de la nécessité du complexe velvet pour la production de ces trois métabolites secondaires.

Outre la patuline, la citrinine et la chaétoglobosine A, *P. expansum* produit une grande variété de métabolites secondaires (Tannous et al., 2018a). Deux gènes impliqués dans le cluster de la roquefortine C sont fortement sous-exprimés chez la souche mutante *PeΔveA* (*PEXP_030140*, $\log_2FC = -2,04$ et *PEXP_030090*, $\log_2FC = -1,28$). Ceci montre que *VeA* joue un rôle dans la régulation positive de la production de roquefortine C par *P. expansum*. Cependant, ces résultats ne sont pas en accord avec ceux reportés par El Hajj Assaf et al. (2018), où *VeA* n'a montré aucun effet sur les gènes composant le cluster biosynthétique de cette mycotoxine. Ceci peut être expliqué par les différences des conditions de cultures entre les deux études.

Chez *A. nidulans*, *VeA* a la capacité d'affecter l'expression de *brlA*, un gène codant pour le facteur de transcription de type C_2H_2 zinc finger *BrlA*, qui joue un rôle primordial dans la reproduction asexuée (Kato et al., 2003). Cependant, les résultats de notre étude montrent que *VeA* n'a pas d'effet significatif sur l'expression de *brlA*.

PEXP_078820 code pour la protéine *SidE*, qui est responsable de la synthèse de la fumarylalanine (Steinchen et al., 2013). Chez le mutant *PeΔveA*, ce gène est surexprimé (\log_2FC

= 1,97) (Tableau 9) ce qui montre que VeA joue un rôle dans l'inhibition de la production de fumarylalanine par *P. expansum*, résultats identiques à ceux obtenus préalablement (El Hajj Assaf et al., 2018). Un autre gène (PEXP_023020, $\log_2FC = 1,43$) codant pour MirB, un transporteur de fer impliqué dans la synthèse de sidéochrome, est également surexprimé chez la souche mutante *Pe Δ veA* (Tableau 9).

Quatre gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ergostérol (*erg11A*, *erg25A*, *erg2* et *erg3*) ont été significativement surexprimés chez la souche mutante *Pe Δ veA*, PEXP_062960, $\log_2FC = 1,59$, et PEXP_027370, $\log_2FC = 1,28$, étant les plus surexprimés (Tableau 9). Ces gènes codent respectivement pour *erg3* et *erg11A*, deux composants clés du cluster biosynthétique de l'ergostérol chez *A. fumigatus* (Long et al., 2017).

Chez le mutant *Pe Δ veA*, le gène PEXP_071760 ($\log_2FC = -2,74$) (Tableau 9) est fortement sous-exprimé. Ce gène code pour une hydrophobine, DewC. Ces résultats montrent que VeA favorise la production d'hydrophobines par *P. expansum*. En effet, les hydrophobines augmentent la pathogénicité des champignons en favorisant la dispersion des conidies et leur adsorption à la surface des cellules hôtes (Aimanianda et al., 2009; Cai et al., 2020; Paris et al., 2003). Cela souligne ainsi l'implication de VeA dans la pathogénicité de *P. expansum*.

PEXP_040110 ($\log_2FC = 7.06$) code pour une protéine, PhiA, impliquée dans le développement des phialides. Chez *A. nidulans*, une mutation du gène *phiA* a engendré une réduction de la croissance du champignon et une inhibition importante de la sporulation (Melin et al., 2003) Les résultats obtenus dans notre étude montrent que VeA inhibe l'expression de ce gène et peut donc être impliqué dans la régulation de la sporulation. Des essais supplémentaires pour évaluer la sporulation chez le mutant *Δ veA* peuvent être envisagés pour valider cette hypothèse.

CONCLUSION

En conclusion, nous avons évalué les rôles de VeA dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans différents processus physiologiques ainsi que dans le métabolisme secondaire chez *P. expansum*.

Nous avons montré que VeA joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme secondaire chez *P. expansum*. L'analyse transcriptomique a montré l'implication de VeA dans la régulation positive de l'expression de l'ensemble des gènes impliqués dans la biosynthèse de la patuline, de la citrinine et de la chaétoglobosine A. En plus du métabolisme secondaire, nous avons également démontré que VeA régule négativement plusieurs processus physiologiques chez *P. expansum*, notamment la conidiation, l'absorption du fer, l'assimilation du nitrate et la biosynthèse de l'ergostérol, ces derniers processus physiologiques étant impliqués dans le métabolisme primaire du champignon.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES



Discussion générale et perspectives

Les mycotoxines sont des composés issus du métabolisme spécialisé des moisissures et présentent un potentiel toxique vis-à-vis des humains et des animaux. Les toxines fongiques sont présentes en tant que contaminants naturels dans de nombreuses denrées alimentaires telles que les céréales, les fruits, les légumes ou les produits laitiers. Les mycotoxines les plus étudiées sont les aflatoxines, les fumonisines, les ochratoxines, la zéaralénone, la patuline (PAT) et les trichothécènes. Ces toxines sont principalement produites par cinq genres de champignons : *Fusarium*, *Aspergillus*, *Claviceps*, *Alternaria* et *Penicillium*.

Les conséquences sanitaires et les pertes économiques issues des aliments contaminés par des mycotoxines ont incité de nombreux chercheurs à essayer de clarifier et de comprendre les mécanismes moléculaires de la production de ces métabolites secondaires. En effet, la production de mycotoxines par les champignons filamenteux peut être très variable et dépend de plusieurs paramètres biotiques et abiotiques. Une compréhension approfondie de ces mécanismes est nécessaire pour développer des stratégies pertinentes de prévention et/ou de contrôle contre ces contaminants et leurs producteurs.

Parmi les mycotoxines citées ci-dessus, la PAT (principalement produite par *P. expansum*) contamine les pommes essentiellement pendant les étapes post-récolte. Du fait de sa grande stabilité et de sa résistance aux traitements thermiques, la PAT est retrouvée dans les produits résultant de la transformation de la matière première contaminée.

Outre la PAT, *P. expansum* produit in vitro de nombreux métabolites secondaires et mycotoxines, comme la citrinine, qui est également trouvée dans les fruits (Martins et al., 2002), la roquefortine C (Andersen et al., 2004), les chaétoglobosines (Andersen et al., 2004), les expansolides (Massias et al., 1990), la fumaryl-DL-alanine (Birkinshaw et al., 1942), les andrastines (Kim et al., 2012) et les communésines (Andersen et al., 2004).

Des études biochimiques et moléculaires menées au fil des années ont permis l'élucidation des étapes de la voie de biosynthèse de la PAT, ainsi que l'identification du cluster de gènes chez *P. expansum* (Tannous et al., 2014).

La croissance, le développement morphologique et la production de métabolites secondaires sont interconnectés et contrôlés par des facteurs de transcription globaux codés par des gènes situés en dehors des groupes de gènes de biosynthèse (Calvo et al., 2002). Ces gènes répondent à de nombreux stimuli environnementaux, notamment le pH, le stress oxydatif, la température, la source de nitrate, la source de carbone, le fer et la lumière. Parmi les facteurs de transcription globaux, le complexe velvet, composé de trois protéines : VeA, VelB (deux protéines de la famille velvet) et LaeA, est impliqué dans la régulation de plusieurs processus cellulaires (Kim et al., 2002; Rauscher et al., 2016) ;

Mon travail s'est concentré sur la création et la caractérisation d'une souche mutante *PeΔvelB* (sujet du Chapitre 1), de la caractérisation de la souche mutante *PeΔlaeA* (déjà disponible au laboratoire) et de l'analyse transcriptomique par microarray de la souche mutante *PeΔveA* (El Hajj Assaf et al., 2018). Chaque souche mutante est ainsi dépourvue d'un facteur de transcription global essentiel impliqué dans la régulation de nombreux processus physiologiques. La délétion de ces trois facteurs de transcription a permis de mieux comprendre l'impact du complexe velvet sur le développement et le métabolisme secondaire de *P. expansum* ainsi que leur impact individuel.

Dans cette partie, une synthèse générale des résultats présentés lors de cette thèse sera abordée, afin de discuter de manière réflexive nos résultats et de les comparer avec les travaux de la littérature.

Ceci nous permettra d'établir et d'avancer de nouvelles hypothèses dans la compréhension des mécanismes régulant le développement et le métabolisme secondaire chez le champignon pathogène psychrotrophe *Penicillium expansum*.

Les résultats de ce travail nous ont conduit à de nouvelles questions que nous tenterons de résoudre tout au long de cette discussion, ainsi qu'à des recommandations qui pourraient améliorer et approfondir les connaissances obtenues tout au long de ce travail.

Il est important de noter que certains des points de discussion déjà présentés dans les chapitres (articles) précédents ne seront pas repris dans cette section.

La régulation par le complexe velvet chez *P. expansum*

Depuis la découverte de VeA il y a quatre décennies et demi, de nombreuses études se sont intéressées à l'élucidation de ses rôles et de son implication dans le processus de régulation globale chez les champignons filamenteux. Les études, qui ont débuté chez l'espèce clé *A. nidulans* (Käfer, 1965), ont par la suite évolué pour inclure des espèces appartenant à d'innombrables genres fongiques (Cary et Calvo, 2008 ; Chang et al., 1993 ; Du et al., 2007 ; Duran et al., 2007; El Hajj Assaf et al., 2018 ; Flaherty et Payne, 1997 ; Hoff et al., 2010 ; Kato et al., 2003 ; Mooney et Yager, 1990 ; Yager, 1992). Par la suite, le rôle des différents facteurs de transcriptions formant le complexe velvet ainsi que les interactions existantes entre eux et leur mode d'action ont été abordés chez différentes souches fongiques. Peu de données existent sur le mode d'action d'une protéine clé de ce complexe, VelB, dans la régulation des processus physiologiques et du métabolisme secondaire chez *P. expansum*. Nous avons par conséquent cherché à établir les rôles de VelB dans la première partie de la présente étude. Par la suite, nous avons analysé l'implication des deux autres composantes, LaeA et VeA dans la régulation de ces mêmes processus pour pouvoir à la fin comparer leur mode d'action chez *P. expansum* et de confronter nos résultats avec les hypothèses déjà existantes dans la littérature.

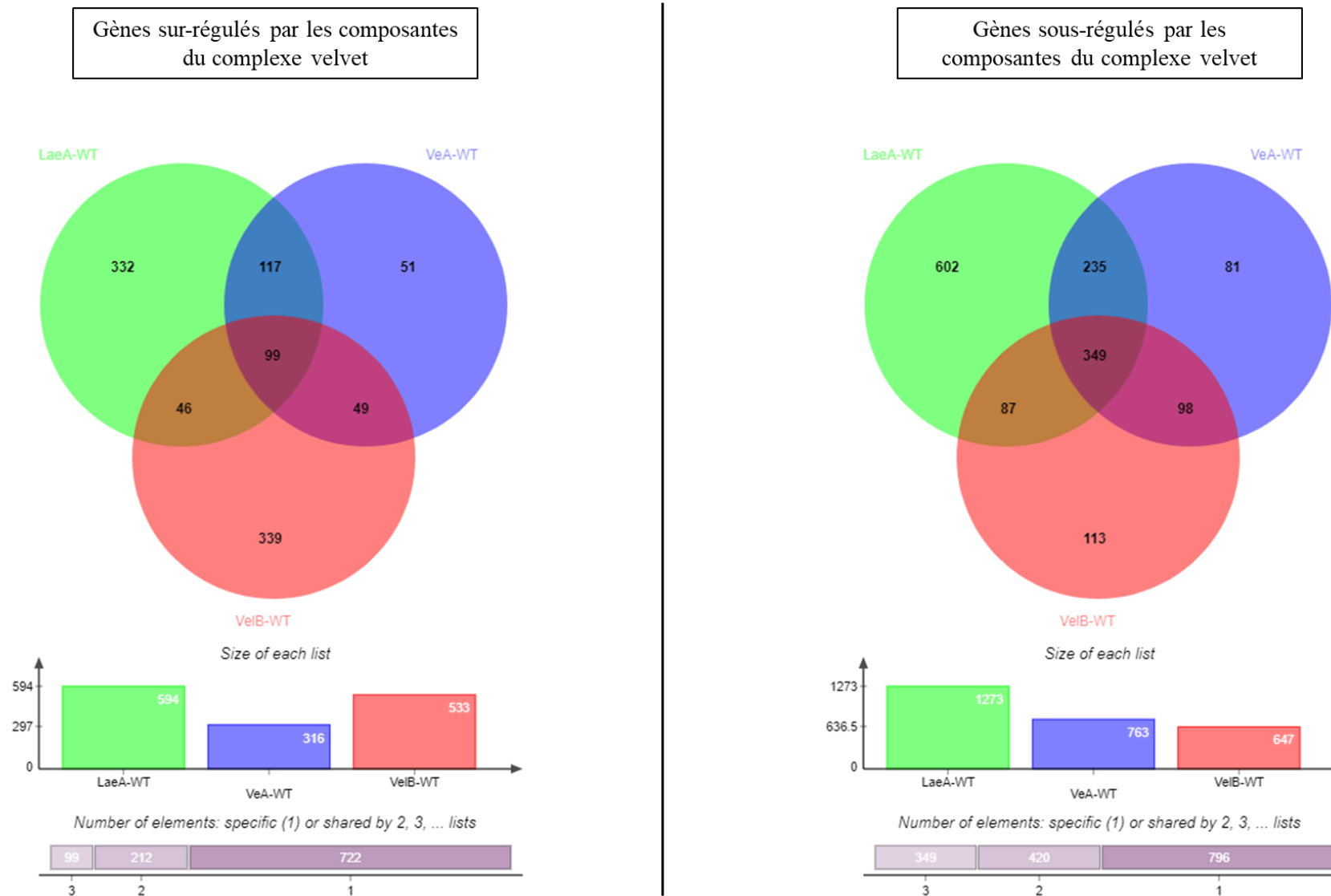


Figure 33. Diagramme de Venn montrant les gènes significativement sous-exprimés et surexprimés chez les souches mutantes $Pe\Delta velB$, $Pe\Delta laeA$ et $Pe\Delta veA$.

Chez *P. expansum*, l'analyse transcriptomique effectuée sur les trois souches mutantes *PeΔvelB*, *PeΔlaeA* et *PeΔveA* a confirmé l'hypothèse que les différents membres du complexe velvet (*VeA*, *VelB* et *LaeA*) peuvent agir d'une manière commune ou de manière indépendante dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans différents processus physiologiques (Figure 33) (Gao et al., 2017 ; Hoff et al., 2010 ; Kopke et al., 2013 ; Yang et al., 2013).

Chacun des trois membres du complexe velvet agit sur un grand nombre de gènes. D'une part, chez le mutant *PeΔvelB*, des 1 180 gènes significativement différentiellement exprimés, 533 sont surexprimés alors que 647 sont sous-exprimés. D'autre part, chez le mutant *PeΔlaeA*, 1867 gènes sont significativement différentiellement exprimés, parmi lesquels 594 sont surexprimés et 1 273 sont sous-exprimés. Finalement, chez le mutant *PeΔveA*, des 1 079 gènes significativement différentiellement exprimés, 316 sont surexprimés alors que 763 sont sous-exprimés. Ces résultats renforcent les hypothèses émises sur chacun des membres du complexe velvet et sur leur rôle de régulateurs globaux chez de nombreuses espèces fongiques. Individuellement, on observe bien l'effet important que génère la délétion de chacun de ces facteurs de transcription. Cependant, la figure montre également qu'il existe, dans un premier lieu, des interactions entre différents couples de facteurs de transcription : *PeΔveA*-*PeΔvelB* ; *PeΔveA*-*PeΔlaeA* et *PeΔlaeA*-*PeΔvelB*. Par ailleurs, les trois membres du complexe velvet régulent de la même manière un nombre élevé de gènes chez *P. expansum*. Chez les trois souches mutantes, on peut noter que 474 gènes communs sont significativement différentiellement exprimés, parmi lesquels 99 sont significativement surexprimés et 349 sont significativement sous-régulés (Figure 33).

Il serait alors intéressant d'investiguer les gènes régulés par le complexe velvet proprement dit et d'essayer de déterminer et de caractériser les protéines pour lesquels ils codent, leurs rôles et leur utilité dans le cycle de vie de *P. expansum*.

Le complexe velvet et la régulation de trois mycotoxines clés : la patuline, la citrinine et la chaétoglobosine A

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à comparer la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la PAT, la citrinine et la chaétoglobosine A par les trois membres du complexe velvet (Figure 34).

La totalité des gènes impliqués dans la biosynthèse de la PAT est significativement sous-régulée chez les mutants *PeΔvelB*, *PeΔlaeA* et *PeΔveA*. Ce résultat est en accord avec les études réalisées par Kumar et al. (2016) et Li et al. (2019), qui ont montré l'intervention des trois protéines VelB, VeA et LaeA ainsi que VelC, une autre protéine de la famille velvet, dans la régulation positive de la synthèse de la PAT chez *P. expansum*. On remarque nettement que la délétion du gène *laeA* a l'effet le plus important sur l'expression des gènes du cluster de la PAT, alors que la délétion des gènes *velB* ou *veA* présentent des effets significatifs mais moins puissants.

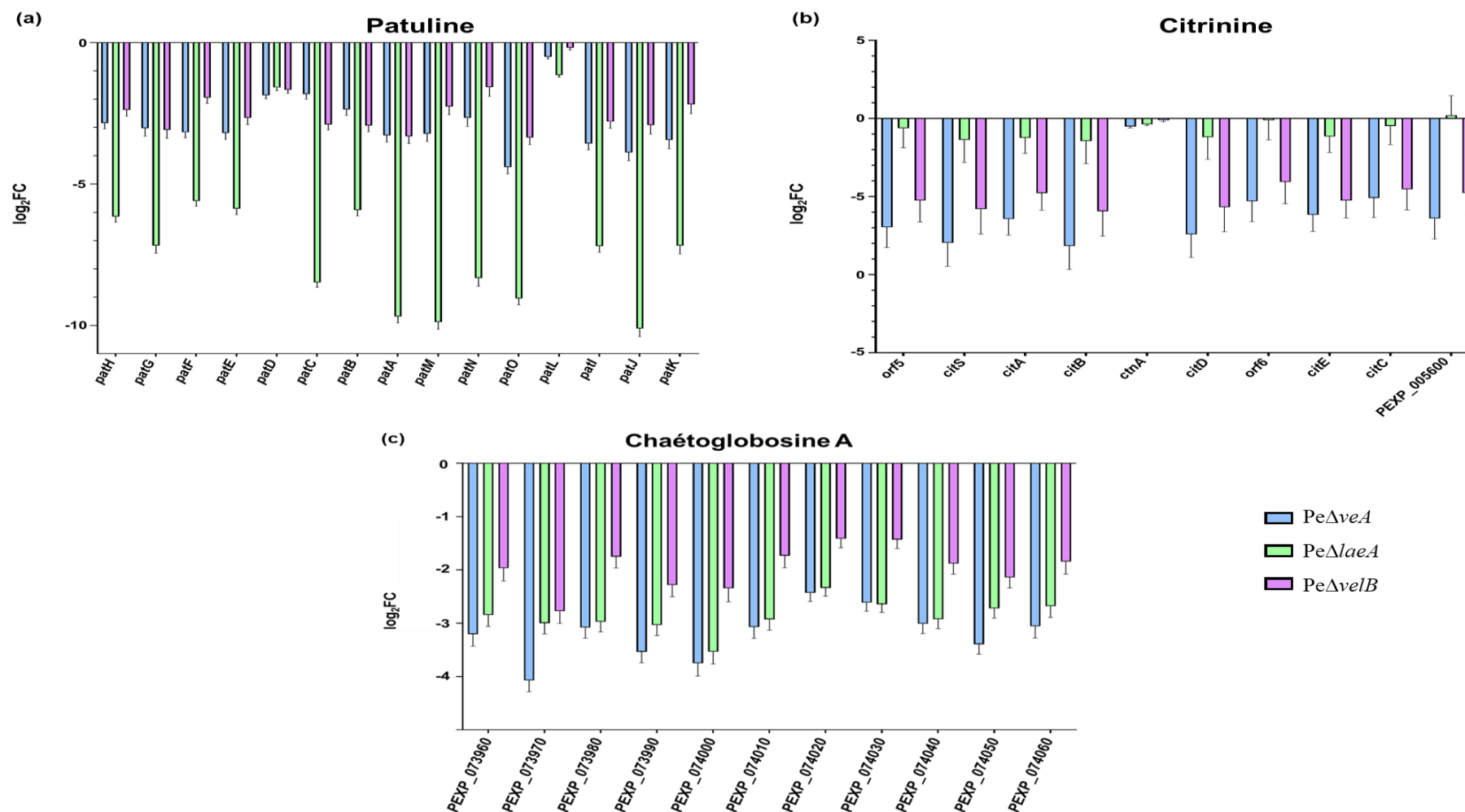


Figure 34. Log₂ fold change (log₂FC) de l'expression des gènes appartenant aux clusters impliqués dans la biosynthèse de la patuline, de la citrinine et de la chaétoglobosine A chez les souches *PeΔvelB*, *PeΔlaeA* et *PeΔveA*. a) Cluster de la patuline (PEXP_094320-PEXP_094460). b) Cluster de la citrinine (PEXP_005510-PEXP_005600). c) Cluster de la chaétoglobosine A (PEXP_073960-PEXP_074060). Les souches ont été cultivées pendant 5 jours à 25°C dans l'obscurité sur un milieu gélosé à base d'extrait de malt. Les graphiques montrent l'erreur standard moyenne de la moyenne (SEM) de quatre réplicats.

L'effet inverse est observé pour le cluster de la citrinine, au niveau duquel la délétion du gène *laeA* affecte le moins l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de cette mycotoxine. C'est VeA qui semble être la plus impliquée dans la régulation positive de la citrinine chez *P. expansum*.

Enfin, la totalité des gènes impliqués dans la biosynthèse de la chaétoglobosine A est fortement sous-exprimée chez les souches mutantes *PeΔvelB*, *PeΔlaeA* et *PeΔveA*.

L'ensemble de ces résultats confirme l'importance du complexe velvet dans la régulation positive de la synthèse de ces mycotoxines chez *P. expansum*.

Par ailleurs, une caractéristique essentielle de cette moisissure réside dans sa capacité à produire une grande variété de métabolites secondaires en général et de mycotoxines en particulier. Il serait donc intéressant d'investiguer le mode de régulation des gènes impliqués dans la biosynthèse d'autres mycotoxines produites par ce champignon.

D'après les diagrammes de Venn présentés dans la Figure 33, on remarque également qu'il existe des gènes régulés communément par deux membres du complexe au lieu des trois. Ainsi, une perspective intéressante serait de créer des doubles mutants *PeΔvelB/PeΔveA* ; *PeΔvelB/PeΔlaeA* ; *PeΔlaeA/PeΔveA* et analyser l'impact de ces doubles mutations sur la production des trois mycotoxines ainsi que sur le métabolisme secondaire global.

Le complexe velvet et la régulation du métabolisme secondaire global

En plus de ces trois mycotoxines qui nous ont particulièrement intéressées dans nos travaux de recherche, *P. expansum* est un producteur de plusieurs autres métabolites secondaires. Pour approfondir ce sujet, nous avons par la suite comparé le mode de régulation par VelB, LaeA et VeA du métabolisme secondaire global de *P. expansum*. L'expression de

différents ‘backbone genes’ (gènes codant pour les enzymes permettant de synthétiser la structure de base des métabolites secondaires) a ainsi été analysée chez chacun des mutants en comparaison de leur expression chez la souche WT (Tableau 10).

Les gènes différentiellement exprimés impliqués dans le métabolisme incluent des diméthylallyl tryptophane synthase (DMATS), des PKS (polycétide synthases), des NRPS (peptide synthase non ribosomales), des NRPS-like, des hybrides PKS/NRPS et des terpènes synthases.

Dans un premier temps, on remarque d’après le tableau que les trois facteurs de transcription VelB, LaeA et VeA agissent de la même manière dans la régulation de plusieurs de ces gènes. A titre d’exemple, les gènes PEXP_030140 et PEXP_030090 qui codent respectivement pour une DMATS et une NRPS impliquées dans la synthèse de la roquefortine C sont régulées positivement par les trois membres du complexe. PEXP_074230 est un gène qui code pour la bicyclogermacrène synthase (Huang et al., 2022) et qui est également régulé positivement par tous les membres du complexe velvet. L’identification de la fonction de cette enzyme a été rendue possible par expression hétérologue chez *E. coli*. Aussi, la production de bicyclogermacrène n’a pas été détectée directement chez *P. expansum*. De même, aucun élément à ce jour ne nous permet de penser que ce composé est pris en charge par d’autres enzymes pour conduire à la synthèse d’un autre métabolite secondaire. Les gènes PEXP_024160, PEXP_102410, ont également été sous-exprimés chez les trois mutants. L’identification ainsi que la caractérisation des produits qui dérivent des clusters dans lesquels sont impliqués ces gènes sera une approche intéressante pour mieux comprendre l’implication du complexe velvet dans la régulation d’autres métabolites secondaires chez *P. expansum*. Par contre, le gène PEXP_043150 est le seul gène régulé différemment par VelB, LaeA et VeA. En effet, ce gène est régulé négativement par VelB et VeA mais positivement par LaeA. Ceci

montre que parfois les composantes du complexe velvet peuvent agir différemment dans la régulation du métabolisme secondaire chez les champignons filamenteux.

De même, il est à noter que *laeA* régule positivement la pigmentation ou plus précisément la synthèse de la DHN-mélanine sans pour autant que ni *velB* ni *veA* soient impliqués.

Cependant, certains gènes ne peuvent être régulés que par un ou deux des membres du complexe velvet. L'interaction entre deux membres de ce complexe a déjà été documentée chez diverses espèces de champignons filamenteux (Amaike and Keller, 2009 ; Bayram et al., 2008 ; Chang et al., 2013 ; Hoff et al., 2010 ; López-Berges et al., 2013 ; Wang et al., 2019 ; Yang et al., 2013). Par exemple, le gène PEXP_058590 est régulé négativement par *LaeA* alors que *VelB* et *VeA* ne sont pas impliqués dans sa régulation ; le gène PEXP_030510 code pour une DMATS impliquée dans le cluster de biosynthèse des communésines alors que le gène PEXP_030540 code pour une PKS impliquée dans ce même cluster. Les résultats ont montré que ces gènes sont positivement régulés par *LaeA* uniquement. *VelB* et *LaeA* agissent simultanément dans la régulation négative des gènes PEXP_063170, PEXP_040330, et PEXP_104890. *VelB* interagit également avec *VeA* pour réguler positivement les gènes PEXP_018230 et PEXP_093300 et négativement le gène PEXP_000410. Ces résultats suggèrent que le champignon ne libère pas toutes les toxines en même temps au cours de son cycle. Il commence par sécréter des métabolites comme la PAT, probablement toxiques pour d'autres microorganismes ou facilitant la colonisation des substrats, ce qui permet son développement. Ensuite, il sécrète d'autres toxines à des fins différentes telles que la formation de mycélium aérien ou la survie aux facteurs extrinsèques et intrinsèques. Il pourrait également être intéressant de réaliser des études de toxicité sur les métabolites secondaires négativement régulés par ces facteurs de transcription et de les comparer à la toxicité de la PAT par exemple.

Table 10. Gènes différentiellement exprimés chez les trois souches mutantes $\Delta velB$, $\Delta laeA$ et ΔveA et impliqués dans le métabolisme secondaire de *Penicillium expansum*.

	<i>Penicillium expansum</i> Gène ID souche d1	Cluster de gènes biosynthétiques	Log ₂ Fold Change Pe $\Delta velB$ vs. sauvage	Log ₂ Fold Change Pe $\Delta laeA$ vs. sauvage	Log ₂ Fold Change Pe ΔveA vs. sauvage	
DMATS (Diméthylallyl tryptophane synthase)	PEXP_030140	Roquefortine C	-1,15	-2,25	-2,04	
	PEXP_030510	Communésines	-	-1,62	-	
	PEXP_058590	-	1,32	-	-	
PKS (Polycétide synthase)	PEXP_030540	Communésines	-	-1,18	-	
	PEXP_024160	-	-1,48	-4,35	-1,89	
	PEXP_063170	-	1,49	1,30	-	
	PEXP_076200	-	1,74	3,86	3,36	
	PEXP_094770	-	2,28	9,87	7,27	
	PEXP_095510	-	-	-5,15	-1,31	
	PEXP_096630	Pigment	-	-1,44	-	
	PEXP_102410	-	-1,22	-2,10	-1,13	
	PEXP_094810	-	-	6,52	4,03	
	PEXP_086670	-	-	1,73	1,21	
	PEXP_093210	Monodictyphénone like	-0,95	-0,70	-	
	PEXP_028920	-	3,31	-	-	
	PEXP_079130	-	-	-	1,01	
	PEXP_000410	-	7,06	-	4,86	
	PEXP_040330	-	2	0,93	-	
	NRPS (Peptide synthétase non ribosomale)	PEXP_012360	-	-	-1,63	-
		PEXP_018960	-	-	-1,75	-
PEXP_029660		-	-	-2,22	-	
PEXP_030090		Roquefortine C	-0,96	-1,76	-1,28	
PEXP_095540		-	-	-5,31	-1,07	
PEXP_096300		-	-	-3,32	-1,28	
PEXP_104890		-	1,88	1,33	-	
PEXP_013580		-	-	1,80	-	
PEXP_085540		-	-	0,87	-	
PEXP_078820		-	2,13	1,22	1,97	

	PEXP_058440	-	-	-1,41	-
	PEXP_015170	-	1,05	-	-
	PEXP_055140	-	-1,38	-1,41	-
Hybride PKS/NRPS	PEXP_107400	-	-	1,24	-
	PEXP_000130	-	-	-0,82	-
	PEXP_060620	-	-	-1,73	-
NRPS-like	PEXP_072870	-	-	-1,38	-
	PEXP_082750	-	-	-2,41	-0,91
	PEXP_045260	-	1,09	-	-
	PEXP_050450	-	2,33	-	-
	PEXP_043150	-	4,10	-1,07	4,32
Terpène synthase	PEXP_018230		-2,16	-	-1,37
	PEXP_074230	Bicyclogermacrène synthase	-1,69	-1,94	-1,31
	PEXP_093300		-1,13	-	-1,22

Le complexe velvet et la biosynthèse de la PAT et de la citrinine : une interconnexion possible ?

Actuellement, peu d'études décrivent une interconnexion entre deux voies de biosynthèse de mycotoxines. Schmidt-Heydt et al. (2012) ont montré que *P. verrucosum* est capable d'orienter son métabolisme secondaire vers la production d'une mycotoxine au détriment d'une seconde, selon les conditions de culture testées. Un milieu à forte concentration en NaCl favorise la production d'ochratoxine A aux dépens de la production de citrinine. Cependant, en présence d'un stress oxydatif (milieu riche en Cu^{2+} ou champignon exposé à la lumière bleue), *P. verrucosum* oriente son métabolisme secondaire vers la production de citrinine (Schmidt-Heydt et al., 2011; Stoll et al., 2014). Cette interconnexion est expliquée par le fait que ces deux mycotoxines sont des polycétides partageant le même précurseur, l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) (Larsen et al., 2001). La production de l'une d'entre elles en très grande quantité dans des conditions spécifiques épuise le stock cellulaire d'acétyl-CoA, limitant ainsi la production de l'autre.

Dans le chapitre 1 de cette étude, les résultats ont montré que la concentration de citrinine produite par la souche sauvage est presque négligeable en comparaison à celle de PAT sur les deux milieux testés. Des observations similaires ont été retrouvées dans l'étude effectuée sur le mutant ΔveA dans notre équipe, pour lequel la concentration de PAT était six à sept fois plus élevée que celle de la citrinine sur MEA et cinquante fois plus élevée sur PDA. Snini et al. (2015) ont obtenu des résultats similaires sur un milieu gélosé à base de pomme. La citrinine et la PAT, qui partagent le même précurseur, l'acétyl-CoA, peuvent très probablement avoir des voies de biosynthèse interconnectées. En fait, étant donné que la PAT est produite en très grandes quantités chez la souche sauvage, le stock cellulaire d'acétyl-CoA peut être diminué au détriment de la production de citrinine (Larsen et al., 2001). En comparant le niveau d'expression des gènes codant pour chacune des polycétides synthèses, *patK* et *citS*, impliquées

dans la première étape de chacune des voies de biosynthèse de la PAT et de la citrinine, respectivement, dans la souche sauvage et les mutants ΔveA , $\Delta velB$ et $\Delta laeA$, aucune différence d'expression n'a été mesurée. Cela pourrait s'expliquer par une efficacité enzymatique plus élevée de l'acide 6- méthylsalicylique synthase (première étape de la voie de biosynthèse de la PAT par rapport à la polycétide synthase impliquée dans la voie de biosynthèse de la citrinine. Il est possible que la synthèse de la PAT soit inhibée lorsque le milieu devient très toxique et c'est alors que la synthèse de la citrinine est déclenchée (Touhami et al., 2018).

Les facteurs de régulation globaux VeA, VelB et LaeA contrôlent positivement mais également négativement un grand nombre de voies de métabolites secondaires chez les champignons filamenteux. Ici, nous avons élucidé leur rôle dans la production de PAT chez *P. expansum*. La mutation des gènes *veA*, *velB* et *laeA* chez la souche sauvage de *P. expansum* a montré que ces gènes régulent positivement, parmi d'autres métabolites, la biosynthèse de PAT et de citrinine. La délétion de ces gènes conduit à l'extinction ou à une forte diminution de l'expression d'une majorité des gènes appartenant aux clusters biosynthétiques de PAT et de citrinine. L'expression du gène *patA* codant pour un transporteur d'acétate a été réduite chez les souches mutantes sur les milieux de culture testés. L'absence de ce transporteur a été accompagnée d'une forte diminution de l'expression du gène *patK* responsable de la transformation de l'acétyl-CoA en acide 6-méthylsalicylique. Ce dernier point peut justifier l'absence de PAT dans le milieu et nous amène à émettre l'hypothèse que le transport de l'acétate pour la biosynthèse de la PAT dans le peroxyosome n'a pas eu lieu dès le départ.

L'acétate présent dans la cellule est pris en charge par le transporteur d'acétate PATA présent dans la membrane du peroxyosome, puis transformé en acétyl-CoA à l'intérieur. L'acide 6-méthylsalicylique synthase prend en charge l'acétyl-CoA pour synthétiser l'acide 6-méthylsalicylique qui est ensuite libéré dans le cytoplasme. Elle est soutenue par les autres enzymes de la voie de biosynthèse de la PAT. Les enzymes sans peptide signal sont

certainement localisées dans le cytoplasme où elles exercent leur activité. Les dernières étapes de la synthèse de la PAT semblent être réalisées dans des vésicules et par des enzymes qui présentent un peptide signal (PATB, PATO, PATF et PATE). La patuline, voire d'autres précurseurs, serait ensuite excrétée dans le milieu extérieur.

Dans ce cas, les stocks d'acétate pourraient rester disponibles pour la biosynthèse de la citrinine dans le cytoplasme, sauf que celle-ci était également absente dans les milieux où les souches mutées étaient cultivées. Ceci nous fait penser que la biosynthèse d'un autre métabolite secondaire, appartenant à la même famille de polycétides, est peut-être interconnectée avec celles de PAT et de citrinine.

La perturbation des gènes *veA*, *velB* et *laeA* a induit la production de deux autres gènes codant pour des polycétides synthases : PEXP_076200 et PEXP_094770. Une caractérisation plus poussée des gènes sous-régulés par ces trois membres devrait être établie afin d'étudier l'interconnexion possible avec les voies de biosynthèse de la PAT et de la citrinine ainsi que l'identification des métabolites correspondants pour lesquels ils codent. Ainsi, leur interconnexion avec d'autres mycotoxines pourra être étudié.

Le complexe velvet intervient dans de nombreux processus physiologiques

Outre la régulation du métabolisme secondaire, les résultats obtenus dans ces travaux de thèse ont montré l'implication du complexe velvet dans la régulation de nombreux processus physiologiques lié au développement fongique, à la conidiation, la pigmentation, et à la synthèse d'hydrophobines, de sidérophores et de l'ergostérol ainsi que l'assimilation du nitrate (Tableau 11).

VelB semble être le membre du complexe velvet le plus impliqué dans la régulation de ces processus variés, puisqu'il contrôle 16 des 39 gènes dont l'expression a été analysée chez

les trois mutants. Parmi ces gènes, seulement deux (PEXP_050790 et PEXP_020490) sont positivement régulés par VelB. Ces gènes codent respectivement pour Fcr3 (facteur de transcription impliqué dans la régulation du développement) et RodB/DewB (Rodlet B, impliquée dans la biosynthèse d'hydrophobines). Les 14 gènes restants sont négativement régulés par VelB et sont impliqués dans le développement des conidiophores, la biosynthèse des sidérophores, l'assimilation du nitrate et la biosynthèse de l'ergostérol, ce qui montre que VelB agit comme inhibiteur de ces processus chez *P. expansum*.

Parmi les gènes régulés par les trois membres du complexe velvet, seul le gène PEXP_071760 codant pour DewC, une protéine impliquée dans la biosynthèse des hydrophobines est significativement sous-exprimé chez les trois mutants. Les autres gènes intervenant dans la biosynthèse des sidérophores (PEXP_078820, PEXP_023020), l'assimilation du nitrate (PEXP_067550 et PEXP_067570) et la biosynthèse de l'ergostérol (PEXP_027370, PEXP_103680, PEXP_097970, PEXP_062960) sont tous significativement surexprimés chez les trois mutants, ce qui montre que le complexe velvet agit en synergie pour assurer l'inhibition de ces processus chez *P. expansum*. Une étude similaire a été réalisée chez *A. ochraceus* (Wang et al., 2019) dans laquelle l'interaction des trois membres du complexe velvet a été mise en évidence pour la régulation du développement asexué, la production d'ochratoxine A et la virulence du champignon.

Des actions antagonistes de VelB et LaeA sont notées dans la régulation de l'expression de trois gènes. En effet, les gènes PEXP_070520 codant pour ConF, une protéine de conidiation, PEXP_104890 codant pour SidD, une peptide synthétase non ribosomale impliquée dans la biosynthèse des sidérophores, et PEXP_068950 codant pour Erg4, une stérol C24 réductase impliquée dans la biosynthèse de l'ergostérol sont tous négativement régulés par VelB et positivement régulés par LaeA.

Dans la littérature, de nombreuses études analysent l'interaction entre VelB et un autre membre de la famille velvet, VosA, chez diverses espèces fongiques (Paterson et al., 1987; Son and Park, 2021; Wu et al., 2021). Cette étude pourrait être complétée par la création d'un mutant $\Delta vosA$ chez *P. expansum* afin d'analyser la régulation de ce facteur de transcription sur le métabolisme secondaire du champignon et ses processus de développement, ainsi que son interaction avec les autres membres du complexe et en particulier VelB.

Il est également important de noter que ces études ont été menées in vitro sur un milieu synthétique. Il serait également intéressant d'effectuer une analyse transcriptomique in vivo, sur le substrat naturel de *P. expansum*. La complexité des matrices et du microbiome à la surface des fruits pourrait affecter différemment le développement et l'agressivité du champignon.

Table 11. Gènes différentiellement exprimés chez les trois souches mutantes $\Delta velB$, $\Delta laeA$ et ΔveA et impliqués dans le développement, la biosynthèse de sidérophores et de l'ergostérol et dans l'assimilation du nitrate.

	<i>Penicillium expansum</i> Gène ID souche d1	Nom de la protéine	Log ₂ Fold Change Pe $\Delta velB$ vs. sauvage	Log ₂ Fold Change Pe $\Delta laeA$ vs. sauvage	Log ₂ Fold Change Pe ΔveA vs. sauvage	Rôle putatif
Régulation du développement	PEXP_050790	Fcr3	-1,38	-	-	Facteur de transcription
	PEXP_049080	FlbD	1,41	-	-	Développement du conidiophore
	PEXP_070520	ConF	1,74	-1,88	-	Conidiation
	PEXP_089660	ConJ	-2,87	-2,00	-	Conidiation
Hydrophobines	PEXP_020490	RodB/ DewB	-0,91	-	-	Rodlet B
	PEXP_071760	DewC	-4,49	-2,27	-2,74	
	PEXP_043320	DewD	-	-1,22	-	-
	PEXP_098360	DewE	1,57	-	-	
Pigmentation Pigment DHN- mélanine like	PEXP_096630	Alb1	-	-1,44	-	Polycétide synthase
	PEXP_097170	Arp1	-	-1,95	-	Pigmentation des conidies
	PEXP_097180	Arp2	-	-2,15	-	HN réductase
	PEXP_097190	Ayg1	-	-2,62	-1,10	-
	PEXP_097110	Abr1	-	-1,20	-	Oxydase multicuivre
Famille des protéines velvet	PEXP_092360	VeA	2,02	-	-6,97	Facteur de transcription
	PEXP_042660	LaeA	0,98	-4,69	-	Facteur de transcription
	PEXP_065290	VelB	-6,10	-	-	
	PEXP_076870	VosA	-	-	-	
	PEXP_009420	VelC	-	-	-	
Biosynthèse des sidérophores	PEXP_104860	SidH	1,11	-	-	Mévalonate énoyl-CoA hydratase
	PEXP_104870	SidF	1,12	-	-	Hydroxyornithine transacylase
	PEXP_104880	SidT	1,62	-	-	Transporteur ABC
	PEXP_104890	SidD	1,88	-1,33	-	Peptide synthétase non ribosomale
	PEXP_104900	SidJ	1,15	-	-	Fusarinine C estérase
	PEXP_047040	SidA	1,00	-	-	L-ornithine N5-oxygénase
	PEXP_071720	SidI	1,10	-	-	Mévalonyl acyl-coA ligase
	PEXP_078820	SidE	2,13	1,22	1,97	Fumaryl-L-alanine synthétase

	PEXP_009060	MirD	1,02	-	-	Transporteur de fer sidéochrome MirD
	PEXP_023020	MirB	2,37	2,15	1,43	Transporteur de fer sidéochrome MirB
	PEXP_048020	Sit1	1,72	-	-	Transporteur de fer sidéochrome 1
	PEXP_108730	Sit2	2,23	-	-	Transporteur de fer sidéochrome 2
Assimilation du nitrate	PEXP_067550	NiaD	2,09	1,54	1,96	Nitrate réductase
	PEXP_067560	NiiA	1,84	-	1,09	Nitrite réductase
	PEXP_067570	CrnA	3,00	2,43	2,49	Transporteur de nitrate
Biosynthèse de l'ergostérol	PEXP_057160	Erg13	0,93	-	-	Hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase
	PEXP_075880	Erg1	-	1,08	-	Squalène époxydase
	PEXP_027370	Erg11A	0,98	2,28	1,28	Stérol 14-alpha-méthyl déméthylase
	PEXP_103680	Erg25a	1,09	1,60	1,07	Stérol C4-méthyl oxydase
	PEXP_097970	Erg2	0,86	1,87	1,14	Stérol C8 isomérase
	PEXP_062960	Erg3	1,66	2,18	1,59	Stérol delta 5-6 désaturase
	PEXP_103230	Erg5b	1,91	-	-	Stérol C22-désaturase
	PEXP_068950	Erg4	1,30	-1,31	-	Stérol C24 réductase
	PEXP_052380	SrbB	1,80	-	-	Facteur de transcription

Le développement fongique et la production de toxines

Une augmentation de la production de métabolites secondaires chez les champignons a été attribuée à la présence de glucose et d'autres carbohydrates. (Wu et al., 2016) ont démontré que le fructose pouvait reprogrammer le métabolome d'une souche de *P. citrinum* en augmentant à la fois la croissance et l'activité antifongique de cette moisissure. Ce sucre, ajouté de manière exogène, affecte l'épaisseur des hyphes fongiques, la production de biomasse, l'expression des gènes et des protéines, la sécrétion d'enzymes et la production de métabolites secondaires (Pessoni et al., 2015). Chez *P. chrysogenum*, le glucose et le saccharose sont impliqués dans la régulation de la biosynthèse de la pénicilline. D'autres sucres tels que le maltose, le fructose et le galactose ont également montré un impact sur la biosynthèse, toutefois moins marqué (Martín, 2000; Revilla et al., 1984). El Hajj Assaf (2018) a montré que l'addition de différents types de sucres (glucose, sucrose et fructose) aux milieux de culture in vitro a favorisé le développement fongique non seulement de la souche sauvage de *P. expansum* mais aussi du mutant ΔveA . Cependant, le développement des champignons n'était pas corrélé à la sécrétion de PAT dans les milieux, quelle que soit la souche. La souche sauvage s'est développée plus rapidement et a produit plus de PAT sur le milieu jusqu'à un certain pourcentage de fructose ajouté. La souche mutante ΔveA a pu se développer mais une quantité très faible de PAT a été sécrétée dans le milieu, quel que soit le pourcentage de fructose ajouté. Dans une étude réalisée par Kumar et al. (2016), on a constaté que le saccharose, un sucre majeur de la pomme, modulait l'accumulation de PAT selon un modèle dose-réponse. Une augmentation de l'amendement de la culture en saccharose a diminué à la fois l'accumulation de PAT et l'expression du régulateur global LaeA. On a également constaté que LaeA régulait plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse de différents métabolites secondaires, y compris les gènes du cluster de la PAT et la synthèse concomitante de PAT in vitro. Ainsi, ces résultats suggèrent l'importance des facteurs abiotiques dans la régulation par LaeA de la PAT et d'autres

métabolites secondaires qui contribuent à la pathogénicité chez *P. expansum*. Ceci prouve que sur diverses variétés de pommes, qui contiennent différents pourcentages de sucres, une souche mutante nulle peut se développer sans qu'aucune (ou une très faible) production de PAT n'ait lieu. Cette souche pourrait être évaluée comme un agent biologique potentiel en concurrence avec la souche sauvage produisant la toxine. Une connaissance exhaustive des autres toxines que le mutant de délétion pourrait produire serait nécessaire pour évaluer la toxicité de cette souche. Ces résultats sont également en accord avec ceux d'autres études (Ballester et al., 2015; Li et al., 2015), qui affirment que l'infection des pommes Golden Delicious par *P. expansum* ne nécessite pas la présence de PAT. La disruption du gène *veA* a diminué la sévérité de la maladie et était essentielle pour obtenir une souche moins agressive (Van der Plank, 1965). Nos résultats ont montré que les souches mutantes *PeΔvelB* et *PeΔlaeA* ont pu se développer sur les pommes Golden Delicious, mais à un rythme plus lent que celui de la souche sauvage, avec une absence de la production de PAT. Une analyse du développement et de la pathogénicité des souches sauvage, *PeΔveA*, *PeΔvelB* et *PeΔlaeA* sur plusieurs variétés de pommes, différant dans leur composition en sucres, pourrait être envisagée.

Le complexe velvet et les « antifungal protein »

Les résultats obtenus lors de ce travail de thèse nous permettent d'identifier tous les gènes directement ou indirectement régulés par le complexe velvet quand il est fonctionnel. En effet, la réconciliation des données des analyses transcriptomiques de chacun des mutants montre que 349 gènes sont positivement régulés par le complexe velvet. Ce dernier participe à la défense du champignon contre d'autres espèces de microorganismes compétiteurs. Il va activer tout un arsenal de défenses développées par le champignon telles que la sécrétion de métabolites secondaires antibiotiques et antifongiques, la sécrétion de peptides ou de petites

protéines au pouvoir antimicrobien mais également des enzymes permettant la dégradation des parois fongiques ou végétales.

Un groupe remarquable de peptides et protéines antimicrobiens est nommé « antifungal protein ». Ces protéines sont structurellement liées aux défensives, une famille de protéines antifongiques présentes chez les plantes, les insectes et les mammifères. Elles sont généralement sécrétées par des espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium* et montrent une activité antifongique contre d'autres espèces fongiques à des concentrations micromolaires, l'espèce productrice développant généralement un système d'autoprotection.

L'analyse génomique montre que le génome de *P. expansum* héberge trois gènes codant pour des protéines de ce groupe. Tous les trois sont régulés par le complexe velvet. Il est maintenant admis que ce groupe est classé dans trois classes sur des bases phylogénétiques (Garrigues et al., 2016). Les trois protéines présentes chez *P. expansum*, PEXP_018930, PEXP_059300 et PEXP_041170 sont respectivement dans les classes A, B et C (Garrigues et al., 2018). Il est important de noter que certaines espèces de *Penicillium* n'ont qu'une seule « antifungal protein ».

PEXP_041170 présente beaucoup d'homologie avec la « bubble protein », une protéine défensive-like qui s'accumule dans les exsudats produit par *P. brevicompactum* (Seibold et al., 2011). Toutes deux se différencient des protéines PAF (*P. rubens*) et AFP (*A. giganteus*) par la présence d'un domaine fonctionnel inconnue DUF1962.

A ce jour, le rôle des protéines de classe C est totalement inconnu, puisqu'aucune activité antifongique n'a été observée in vitro (Garrigues et al., 2018). Il n'en est pas de même avec les protéines de la classe A et B. Des expériences antérieures ont montré que PeFA (classe A) est une protéine antifongique la plus efficace vis-à-vis d'espèces phytopathogènes telles que *P. digitatum* et *Botrytis cinerea* conférant in planta une certaine protection contre ces infections.

Bien qu'AFP et PAF soient assez similaires au niveau de leurs structures et de leurs spectres antifongiques, leurs modes d'action sont significativement différents. AFP qui est assez similaire à PEXP_059300 inhibe la synthèse de la chitine, perturbant ainsi la formation de la paroi fongique, tandis que PAF similaire à PEXP_018930 est internalisé dans les cellules cibles et déclenche l'apoptose de ces cellules.

CONCLUSION



Conclusion

En conclusion, le métabolisme secondaire ou spécialisé des champignons est très diversifié et régulé par de nombreux facteurs. De ce fait, la diversité des métabolites secondaires leur confère des rôles soit positifs (par exemple, dans les secteurs médical et agricole) soit négatifs (par exemple, la virulence et la pathogénicité). Il est donc essentiel d'approfondir nos connaissances à leur sujet. Les pommes sont parmi les fruits les plus consommés et les plus exportés dans le monde. De plus, elles interviennent dans la composition de plusieurs produits alimentaires destinés aux nourrissons et aux jeunes enfants qui pourraient être contaminés par la PAT sécrétée par le champignon phytopathogène *Penicillium expansum*, responsable de la pourriture bleue de la pomme.

Dans cette thèse, nous avons abordé la régulation du développement et du métabolisme secondaire chez *P. expansum* par différentes composantes d'un complexe largement conservé et étudié chez les champignons filamenteux, et qui n'est autre que le complexe velvet.

Nous nous sommes concentrés sur la caractérisation des trois facteurs de transcription globaux composant ce complexe, VelB, LaeA et VeA et nous avons étudié leur impact sur différents processus physiologiques ainsi que sur le métabolisme secondaire du champignon in vivo et in vitro.

Les moisissures et les mycotoxines engendrent des pertes économiques importantes et posent de graves risques pour la santé publique. Malheureusement, leur développement de certaines espèces et les problèmes inhérents risquent d'augmenter avec le changement climatique. Par conséquent, le défi de la recherche va également évoluer, soulignant l'importance de mener des recherches multidisciplinaires (moléculaires, physiologiques, toxicologiques ou chimiques) et de continuer à travailler sur les mécanismes de régulation

moléculaire impliqués dans la biosynthèse des mycotoxines en vue de trouver des substances naturelles ou/et des micro-organismes capables d'inhiber leur biosynthèse.

REFERENCES



A

- Aanen, D., Hoekstra, R., 2007. Why Sex Is Good: On Fungi and Beyond. <https://doi.org/10.1128/9781555815837.CH32>
- Adams, T.H., Wieser, J.K., Yu, J.H., 1998a. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 62, 35–54. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.1.35-54.1998>
- Adams, T.H., Wieser, J.K., Yu, J.H., 1998b. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 62, 35–54. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.1.35-54.1998>
- Aimanianda, V., Bayry, J., Bozza, S., Kniemeyer, O., Perruccio, K., Elluru, S.R., Clavaud, C., Paris, S., Brakhage, A.A., Kaveri, S.V., Romani, L., Latgé, J.-P., 2009. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* 460, 1117–1121. <https://doi.org/10.1038/nature08264>
- Al Riachy, R., Strub, C., Durand, N., Guibert, B., Guichard, H., Constancias, F., Chochois, V., Lopez-Lauri, F., Fontana, A., Schorr-Galindo, S., 2021. Microbiome status of cider-apples, from orchard to processing, with a special focus on *Penicillium expansum* occurrence and patulin contamination. *J. Fungi*. <https://doi.org/10.3390/jof7040244>
- Alassane-Kpembi, I., Kolf-Clauw, M., Gauthier, T., Abrami, R., Abiola, F.A., Oswald, I.P., Puel, O., 2013. New insights into mycotoxin mixtures: the toxicity of low doses of Type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.023>
- Alassane-Kpembi, I., Schatzmayr, G., Taranu, I., Marin, D., Puel, O., Oswald, I.P., 2017. Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 3489–3507. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1140632>

- Ali, H., Ries, M.I., Nijland, J.G., Lankhorst, P.P., Hankemeier, T., Bovenberg, R.A.L., Vreeken, R.J., Driessen, A.J.M., 2013. A Branched Biosynthetic Pathway Is Involved in Production of Roquefortine and Related Compounds in *Penicillium chrysogenum*. *PLOS-One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065328>
- Alkhayat, F., Chang Kim, S., Yu, J.-H., 2015. Genetic control of asexual development in *aspergillus fumigatus*. *Adv. Appl. Microbiol.* 90, 93–107. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.004>
- Amaike, S., Keller, N.P., 2009. Distinct roles for VeA and LaeA in development and pathogenesis of *aspergillus flavus*. *Eukaryot. Cell* 8, 1051–1060. <https://doi.org/10.1128/EC.00088-09>
- Andersen, B., Smedsgaard, J., Frisvad, J.C., 2004. *Penicillium expansum*: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2421–2428. <https://doi.org/10.1021/jf035406k>
- Artigot, M.P., Loiseau, N., Laffitte, J., Mas-Reguieg, L., Tadrict, S., Oswald, I.P., Puel, O., 2009a. Molecular cloning and functional characterization of two CYP619 cytochrome P450s involved in biosynthesis of patulin in *Aspergillus clavatus*. *Microbiology* 155, 1738–1747. <https://doi.org/10.1099/mic.0.024836-0>
- Artigot, M.P., Loiseau, N., Laffitte, J., Mas-Reguieg, L., Tadrict, S., Oswald, I.P., Puel, O., 2009b. Molecular cloning and functional characterization of two CYP619 cytochrome P450s involved in biosynthesis of patulin in *Aspergillus clavatus*. *Microbiology* 155, 1738–1747. <https://doi.org/10.1099/mic.0.024836-0>
- Aydogdu, H., Güçer, Y., 2009. Microfungi and mycotoxins of grapes and grape products. *Trakia J. Sci.* 7, 211–214.

B

- Baba, S., Kinoshita, H., Nihira, T., 2012. Identification and characterization of *Penicillium citrinum* VeA and LaeA as global regulators for ML-236B production. *Curr. Genet.* 58, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00294-011-0359-x>
- Baert, K., Devlieghere, F., Flyps, H., Oosterlinck, M., Ahmed, M., Rajković, A., Verlinden, B., Nicolai, B., Debevere, J., Meulenaer, B.D., 2007. Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. *Int. J. Food Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.061>
- Ballester, A., Marcet-Houben, M., Levin, E., Sela, N., Selma-Lázaro, C., Carmona, L., Wisniewski, M., Droby, S., González-Candelas, L., Gabaldón, T., 2015. Genome, Transcriptome, and Functional Analyses of *Penicillium expansum* Provide New Insights Into Secondary Metabolism and Pathogenicity. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI.* <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-14-0261-FI>
- Baltussen, T.J.H., Zoll, J., Verweij, P.E., Melchers, W.J.G., 2020. Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus* spp. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 84, e00049-19. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00049-19>
- Banani, H., Marcet-Houben, M., Ballester, A.-R., Abbruscato, P., González-Candelas, L., Gabaldón, T., Spadaro, D., 2016. Genome sequencing and secondary metabolism of the postharvest pathogen *Penicillium griseofulvum*. *BMC Genomics* 17, 19. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2347-x>
- Banke, S., Frisvad, J.C., Rosendahl, S., 1997. Taxonomy of *Penicillium chrysogenum* and related xerophilic species, based on isozyme analysis. *Mycol. Res.* 101, 617–624. <https://doi.org/10.1017/S0953756296003048>

- Barad, S., Espeso, E.A., Sherman, A., Prusky, D., 2016. Ammonia activates pacC and patulin accumulation in an acidic environment during apple colonization by *Penicillium expansum*. *Mol. Plant Pathol.* 17, 727–740. <https://doi.org/10.1111/mpp.12327>
- Bartholomew, H.P., Bradshaw, M.J., Macarisin, O., Gaskins, V.L., Fonseca, J.M., Jurick, W.M., 2022. More than a Virulence Factor: Patulin Is a Non-Host-Specific Toxin that Inhibits Postharvest Phytopathogens and Requires Efflux for *Penicillium* Tolerance. *Phytopathology*® 112, 1165–1174. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-21-0371-R>
- Bayram, Ö., Braus, G., 2011. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: The velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 1–24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00285.x>
- Bayram, Ozgür, Krappmann, S., Ni, M., Bok, J.W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeyer, S., Kwon, N.-J., Keller, N.P., Yu, J.-H., Braus, G.H., 2008. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320, 1504–1506. <https://doi.org/10.1126/science.1155888>
- Bayram, O., Krappmann, S., Seiler, S., Vogt, N., Braus, G., 2008. *Neurospora crassa* ve-1 affects asexual conidiation. *Fungal Genet. Biol.* FG B. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2007.06.001>
- Beck, J., Ripka, S., Siegner, A., Schiltz, E., Schweizer, E., 1990. The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*. Its gene structure relative to that of other polyketide synthases. *Eur. J. Biochem.* 192, 487–498. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19252.x>
- Behr, M., Serchi, T., Cocco, E., Guignard, C., Sergeant, K., Renaut, J., Evers, D., 2014. Description of the mechanisms underlying geosmin production in *Penicillium expansum* using proteomics. *J. Proteomics* 96, 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.034>

- Bennett, J.W., Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 497–516.
<https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- Berger, K.J., Guss, D.A., 2005. Mycotoxins revisited: Part I. *J. Emerg. Med.* 28, 53–62.
<https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2004.08.013>
- Bills, G.F., Gloer, J.B., 2016. Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. *Microbiol. Spectr.* 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0009-2016>
- Birkinshaw, J., Raistrick, H., Smith, G., 1942. Studies in the biochemistry of micro-organisms: Fumaryl-dl-alanine (fumaromono-dl-alanide), a metabolic product of *Penicillium resticulosum* sp.nov. *Biochem. J.* <https://doi.org/10.1042/BJ0360829>
- Blaha, L., Sabater, S., Babica, P., Vilalta, E., Marsálek, B., 2004. Geosmin occurrence in riverine cyanobacterial mats: is it causing a significant health hazard? *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 49, 307–12.
<https://doi.org/10.2166/wst.2004.0590>
- Blanc, P.J., Laussac, J.P., Le Bars, J., Le Bars, P., Loret, M.O., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J.C., Santerre, A.L., Goma, G., 1995. Characterization of monascidin A from *Monascus as citrinin*. *Int. J. Food Microbiol.* 27, 201–213. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00167-5](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00167-5)
- Boni, A., Ambrosio, D., Cupertino, F., Montenegro-Montero, A., Virgilio, S., Zanolli Freitas, F., Corrocher, F., Goncalves, R., Yang, A., Weirauch, M., Hughes, T., Larrondo, L., Bertolini, M., 2018. *Neurospora crassa* developmental control mediated by the FLB-3 transcription factor. *Fungal Biol.* 122. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.01.004>
- Boylan, M.T., Mirabito, P.M., Willett, C.E., Zimmerman, C.R., Timberlake, W.E., 1987. Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3113–3118.
<https://doi.org/10.1128/mcb.7.9.3113-3118.1987>

- Boysen, M., Skouboe, P., Frisvad, J., Rossen, L., 1996. Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles. *Microbiology* 142, 541–549. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-3-541>
- Brown, J.P., Cartwright, N.J., Robertson, A., Whalley, W.B., 1948. Structure of Citrinin. *Nature* 162, 72–73. <https://doi.org/10.1038/162072b0>
- Bryden, W., 2012. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implication of animal productivity and feed security. *Anim. Feed Sci. Technol.* 173, 134–158. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014>
- Burton, H.S., 1949. Antibiotics from penicillia. *Br. J. Exp. Pathol.* 30, 151–158.
- Butler, G., Rasmussen, M.D., Lin, M.F., Santos, M.A.S., Sakthikumar, S., Munro, C., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J., Agrafioti, I., Arnaud, M.B., Bates, S., Brown, A., Brunke, S., Costanzo, M., Fitzpatrick, D., Groot, P.D. de, Harris, D., Hoyer, L., Hube, B., Klis, F., Kodira, C., Lennard, N., Logue, M.E., Martin, R., Neiman, A., Nikolaou, E., Quail, M., Quinn, J., Santos, M.C., Schmitzberger, F., Sherlock, G., Shah, P., Silverstein, K., Skrzypek, M., Soll, D., Staggs, R., Stansfield, I., Stumpf, M., Sudbery, P., Thyagarajan, S., Zeng, Q., Berman, J., Berriman, M., Heitman, J., Gow, N., Lorenz, M., Birren, B., Kellis, M., Cuomo, C., 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature08064>

C

- Cai, F., Gao, R., Zhao, Z., Ding, M., Jiang, S., Yagtu, C., Zhu, H., Zhang, J., Ebner, T., Mayrhofer-Reinhartshuber, M., Kainz, P., Chenthamara, K., Akcapinar, G.B., Shen, Q., Druzhinina, I.S., 2020. Evolutionary compromises in fungal fitness: hydrophobins can hinder the adverse dispersal of conidiospores and challenge their survival. *ISME J.* 14, 2610–2624. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0709-0>

- Calvo, A.M., 2008. The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet. Biol.* FG B 45, 1053–1061. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.03.014>
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., Keller, N.P., 2002. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 447–459. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.447-459.2002>
- Cao, J., Zhang, H., Yang, Q., Ren, R.-X., 2013. Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue mold rot and patulin degradation in apples. *Int. J. Food Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.007>
- Carbone, I., Jakobek, J.L., Ramirez-Prado, J.H., Horn, B.W., 2007. Recombination, balancing selection and adaptive evolution in the aflatoxin gene cluster of *Aspergillus parasiticus*. *Mol. Ecol.* 16, 4401–4417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03464.x>
- Cary, J.W., Calvo, A.M., 2008. Regulation of *Aspergillus* Mycotoxin Biosynthesis. *Toxin Rev.* 27, 347–370. <https://doi.org/10.1080/15569540802373999>
- Cary, J.W., Han, Z., Yin, Y., Lohmar, J.M., Shantappa, S., Harris-Coward, P.Y., Mack, B., Ehrlich, K.C., Wei, Q., Arroyo-Manzanares, N., Uka, V., Vanhaecke, L., Bhatnagar, D., Yu, J., Nierman, W.C., Johns, M.A., Sorensen, D., Shen, H., De Saeger, S., Diana Di Mavungu, J., Calvo, A.M., 2015. Transcriptome Analysis of *Aspergillus flavus* Reveals veA-Dependent Regulation of Secondary Metabolite Gene Clusters, Including the Novel Aflavarin Cluster. *Eukaryot. Cell* 14, 983–997. <https://doi.org/10.1128/EC.00092-15>
- Casquete, R., Rodríguez, A., Hernández, A., Martín, A., Bartolomé, T., Córdoba, J.J., Córdoba, M.G., 2017. Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins during Smoked Paprika Production. *J. Food Prot.* 80, 2068–2077. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-164>

- Castoria, R., Mannina, L., Durán-Patrón, R., Maffei, F., Sobolev, A.P., De Felice, D.V., Pinedo-Rivilla, C., Ritieni, A., Ferracane, R., Wright, S.A.I., 2011. Conversion of the mycotoxin patulin to the less toxic desoxypatulinic acid by the biocontrol yeast *Rhodosporidium kratochvilovae* strain LS11. *J. Agric. Food Chem.* 59, 11571–11578. <https://doi.org/10.1021/jf203098v>
- Castoria, R., Wright, S.A.I., Droby, S., 2008. Chapter 16 - Biological Control of Mycotoxigenic Fungi in Fruits, in: Barkai-Golan, R., Paster, N. (Eds.), *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Academic Press, San Diego, pp. 311–333. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374126-4.00016-4>
- Chang, P.K., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Bennett, J.W., Linz, J.E., Woloshuk, C.P., Payne, G.A., 1993. Cloning of the *Aspergillus parasiticus* *apa-2* gene associated with the regulation of aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3273–3279. <https://doi.org/10.1128/aem.59.10.3273-3279.1993>
- Chang, P.-K., Scharfenstein, L.L., Li, P., Ehrlich, K.C., 2013. *Aspergillus flavus* VelB acts distinctly from VeA in conidiation and may coordinate with FluG to modulate sclerotial production. *Fungal Genet. Biol.* 58–59, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.08.009>
- Chen, J., Zhang, W., Guo, Q., Yu, W., Zhang, Y., He, B., 2020. Bioactivities and Future Perspectives of Chaetoglobosins. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2020, 8574084. <https://doi.org/10.1155/2020/8574084>
- Chen, Y., Peng, H.-M., Wang, X., Li, B.-Q., Long, M.-Y., Tian, S.-P., 2017. Biodegradation Mechanisms of Patulin in *Candida guilliermondii*: An iTRAQ-Based Proteomic Analysis. *Toxins* 9, E48. <https://doi.org/10.3390/toxins9020048>

- Chien, M.M., Schiff, P.L., Slatkin, D.J., Knapp, J.E., 1977. Metabolites of aspergilli. III. The isolation of citrinin, dihydrocitrinone and sclerin from aspergillus carneus. *Lloydia* 40, 301–302.
- Chromatography of mycotoxins : techniques and applications, 1993. . Amsterdam ; New York : Elsevier.
- Chunmei, J., Junling, S., Qi'an, H., Yanlin, L., 2013. Occurrence of toxin-producing fungi in intact and rotten table and wine grapes and related influencing factors. *Food Control* 31, 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.015>
- Clemmensen, S.E., Kromphardt, K.J.K., Frandsen, R.J.N., 2022. Marker-free CRISPR-Cas9 based genetic engineering of the phytopathogenic fungus, *Penicillium expansum*. *Fungal Genet. Biol.* FG B 160, 103689. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2022.103689>
- Coton, E., Coton, M., Hymery, N., Mounier, J., Jany, J.-L., 2020. *Penicillium roqueforti*: an overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications. *Fungal Biol. Rev.* 34, 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.03.001>
- D**
- da Rocha Neto, A.C., Maraschin, M., Di Piero, R.M., 2015. Antifungal activity of salicylic acid against *Penicillium expansum* and its possible mechanisms of action. *Int. J. Food Microbiol.* 215, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.018>
- Dalsgaard, P.W., Blunt, J.W., Munro, M.H.G., Frisvad, J.C., Christophersen, C., 2005. Communesins G and H, New Alkaloids from the Psychrotolerant Fungus *Penicillium rivulum*. *J. Nat. Prod.* 68, 258–261. <https://doi.org/10.1021/np049646l>
- De Curtis, F., Caputo, L., Castoria, R., Lima, G., Stea, G., De Cicco, V., 2004. Use of fluorescent amplified fragment length polymorphism (FAFLP) to identify specific molecular markers for the biocontrol agent *Aureobasidium pullulans* strain LS30.

- Postharvest Biol. Technol. 34, 179–186.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.05.008>
- de Jonge, R., van Esse, H.P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H.A.J., Thomma, B.P.H.J., 2010. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* 329, 953–955.
<https://doi.org/10.1126/science.1190859>
- de Oliveira Filho, J.W.G., Islam, M.T., Ali, E.S., Uddin, S.J., Santos, J.V. de O., de Alencar, M.V.O.B., Júnior, A.L.G., Paz, M.F.C.J., de Brito, M.D.R.M., E Sousa, J.M. de C., Shaw, S., de Medeiros, M. das G.F., Dantas, S.M.M. de M., Rolim, H.M.L., Ferreira, P.M.P., Kamal, M.A., Pieczynska, M.D., Das, N., Gupta, V.K., Mocan, A., Dos Santos Andrade, T. de J.A., Singh, B.N., Mishra, S.K., Atanasov, A.G., Melo-Cavalcante, A.A. de C., 2017. A comprehensive review on biological properties of citrinin. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 110, 130–141.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.002>
- Delgado, J., Ballester, A.-R., González-Candelas, L., Núñez, F., 2022. Impact of the antifungal protein PgAFP on the proteome and patulin production of *Penicillium expansum* on apple-based medium. *Int. J. Food Microbiol.* 363, 109511.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109511>
- Dhingra, S., Lind, A.L., Lin, H.-C., Tang, Y., Rokas, A., Calvo, A.M., 2013. The fumagillin gene cluster, an example of hundreds of genes under veA control in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE* 8, e77147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077147>
- Dombrink-Kurtzman, M.A., 2007. The sequence of the isoeopoxydon dehydrogenase gene of the patulin biosynthetic pathway in *Penicillium* species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91, 179–189. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9109-3>

- Dombrink-Kurtzman, M.A., Blackburn, J.A., 2005. Evaluation of several culture media for production of patulin by *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.07.006>
- Du, W., Obrian, G.R., Payne, G.A., 2007. Function and regulation of aflJ in the accumulation of aflatoxin early pathway intermediate in *Aspergillus flavus*. *Food Addit. Contam.* 24, 1043–1050. <https://doi.org/10.1080/02652030701513826>
- Dukare, A.S., Singh, R.K., Jangra, R.K., Bhushan, B., 2022. Non-Fungicides-Based Promising Technologies for Managing Post-Production *Penicillium* Induced Spoilage in Horticultural Commodities: A Comprehensive Review. *Food Rev. Int.* 38, 227–267. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1727497>
- Duran, R.M., Cary, J.W., Calvo, A.M., 2007. Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by veA, a gene necessary for sclerotial formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 1158–1168. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0581-5>
- Dyer, P.S., 2007. Sexual Reproduction and Significance of MAT in the Aspergilli, in: *Sex in Fungi*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 123–142. <https://doi.org/10.1128/9781555815837.ch7>
- Dyer, P.S., Kück, U., 2017. Sex and the Imperfect Fungi. *Microbiol. Spectr.* 5, 5.3.10. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0043-2017>
- Dyer, P.S., O’Gorman, C.M., 2011. A fungal sexual revolution: *Aspergillus* and *Penicillium* show the way. *Curr. Opin. Microbiol., Growth and development: eukaryotes/prokaryotes* 14, 649–654. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.10.001>
- Dyer, P.S., Paoletti, M., 2005. Reproduction in *Aspergillus fumigatus*: sexuality in a supposedly asexual species? *Med. Mycol.* 43 Suppl 1, S7-14. <https://doi.org/10.1080/13693780400029015>

E

- EC Commission Regulation No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Available at: <https://leap.unep.org/countries/eu/national-legislation/commission-regulation-ec-no-18812006-setting-maximum-levels> [Accessed 2 June 2022].
- Egmond, H.P. van, Jonker, M.A., 2003. Current situation on regulations for mycotoxins. *Mycotoxins 2003*, 1–15. https://doi.org/10.2520/myco1975.2003.Suppl3_1
- El Hajj Assaf, C., 2018. Patulin, main mycotoxin of the apple industry: regulation of its biosynthetic pathway and influence of processing factors in cloudy apple juice production (These de doctorat). Toulouse, INPT.
- El Hajj Assaf, C., Snini, S.P., Tadrist, S., Bailly, S., Naylies, C., Oswald, I.P., Lorber, S., Puel, O., 2018a. Impact of veA on the development, aggressiveness, dissemination and secondary metabolism of *Penicillium expansum*. *Mol. Plant Pathol.* 19, 1971–1983. <https://doi.org/10.1111/mpp.12673>
- El Hajj Assaf, C., Snini, S.P., Tadrist, S., Bailly, S., Naylies, C., Oswald, I.P., Lorber, S., Puel, O., 2018b. Impact of veA on the development, aggressiveness, dissemination and secondary metabolism of *Penicillium expansum*. *Mol. Plant Pathol.* <https://doi.org/10.1111/mpp.12673>
- El-banna, A.A., Pitt, J.I., Leistner, L., 1987. Production of Mycotoxins by *Penicillium* Species. *Syst. Appl. Microbiol.* 10, 42–46. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(87\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(87)80008-5)
- Eom, T.-J., Moon, H., Yu, J.-H., Park, H.-S., 2018. Characterization of the velvet regulators in *Aspergillus flavus*. *J. Microbiol.* 56, 893–901. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8417-4>

- Errampalli, D., 2014. Chapter 6 - *Penicillium expansum* (Blue Mold), in: Bautista-Baños, S. (Ed.), Postharvest Decay. Academic Press, San Diego, pp. 189–231.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00006-5>
- Eskola, M., Kos, G., Elliott, C., Hajšlová, J., Krska, R., Mayar, S., 2019. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited “FAO estimate” of 25%. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>
- F**
- Fan, Y.-Q., Li, P.-H., Chao, Y.-X., Chen, H., Du, N., He, Q.-X., Liu, K.-C., 2015. Alkaloids with Cardiovascular Effects from the Marine-Derived Fungus *Penicillium expansum* Y32. *Mar. Drugs* 13, 6489–6504. <https://doi.org/10.3390/md13106489>
- Fedeshko, R.W., 1992. Polyketide enzymes and genes in *penicillium urticae*. University of Calgary. <https://doi.org/10.11575/PRISM/15229>
- Feliziani, E., Lichter, A., Smilanick, J.L., Ippolito, A., 2016. Disinfecting agents for controlling fruit and vegetable diseases after harvest. *Postharvest Biol. Technol., Alternatives to the use of synthetic fungicides for the control of postharvest decay of fruit and vegetables: current status and future perspectives* 122, 53–69.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.016>
- Filténborg, O., Frisvad, J.C., Thrane, U., 1996. Moulds in food spoilage. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 85–102. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01153-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01153-1)
- Flaherty, J.E., Payne, G.A., 1997. Overexpression of aflR Leads to Upregulation of Pathway Gene Transcription and Increased Aflatoxin Production in *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3995–4000.
- Flajs, D., Peraica, M., 2009. Toxicological properties of citrinin. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 60, 457–464. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-60-2009-1992>

- Fox, E.M., Howlett, B.J., 2008. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Curr. Opin. Microbiol., Growth and Development: Eukaryotes/Prokaryotes* 11, 481–487. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.10.007>
- Frisvad, J. c., 2018. A critical review of producers of small lactone mycotoxins: patulin, penicillic acid and moniliformin. *World Mycotoxin J.* 11, 73–100. <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2294>
- Frisvad, J., Samson, R., 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and airborne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud. Mycol.* 2004, 1–173.
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O., 1990. Revision of *Penicillium* Subgenus *Furcatum* Based on Secondary Metabolites and Conventional Characters, in: Samson, R.A., Pitt, J.I. (Eds.), *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*, NATO ASI Series. Springer US, Boston, MA, pp. 159–172. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3579-3_14
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O., 1989. Terverticillate *Penicillia*: Chemotaxonomy and Mycotoxin Production. *Mycologia* 81, 837–861. <https://doi.org/10.1080/00275514.1989.12025674>
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O., 1983. Classification of terverticillate *penicillia* based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1301–1310.
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O., Wicklow, D.T., 1987. Terverticillate *penicillia* isolated from underground seed caches and cheek pouches of banner-tailed kangaroo rats (*Dipodomys spectabilis*). *Can. J. Bot.* 65, 765–773. <https://doi.org/10.1139/b87-102>
- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O., Samson, R.A., 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud. Mycol.* 49, 201–241.

G

- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.-J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Lee, S.-I., Baştürkmen, M., Spevak, C.C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scazzocchio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G.H., Draht, O., Busch, S., D'Enfert, C., Bouchier, C., Goldman, G.H., Bell-Pedersen, D., Griffiths-Jones, S., Doonan, J.H., Yu, J., Vienken, K., Pain, A., Freitag, M., Selker, E.U., Archer, D.B., Peñalva, M.Á., Oakley, B.R., Momany, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Asai, K., Machida, M., Nierman, W.C., Denning, D.W., Caddick, M., Hynes, M., Paoletti, M., Fischer, R., Miller, B., Dyer, P., Sachs, M.S., Osmani, S.A., Birren, B.W., 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438, 1105–1115.
- Gao, J.-X., Yu, C.-J., Wang, M., Sun, J.-N., Li, Y.-Q., Chen, J., 2017. Involvement of a velvet protein ClVelB in the regulation of vegetative differentiation, oxidative stress response, secondary metabolism, and virulence in *Curvularia lunata*. *Sci. Rep.* 7, 46054. <https://doi.org/10.1038/srep46054>
- García-Estrada, C., Ullán, R.V., Albillos, S.M., Fernández-Bodega, M.Á., Durek, P., von Döhren, H., Martín, J.F., 2011. A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrín in *Penicillium chrysogenum*. *Chem. Biol.* 18, 1499–1512. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.08.012>
- Gargas, A., DePriest, P., Grube, M., Tehler, A., 1995. Multiple Origins of Lichen Symbioses in Fungi Suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science* 268, 1492–5. <https://doi.org/10.1126/science.7770775>
- Garrigues, S., Gandía, M., Castillo, L., Coca, M., Marx, F., Marcos, J.F., Manzanares, P., 2018. Three Antifungal Proteins From *Penicillium expansum*: Different Patterns of Production

- and Antifungal Activity. *Front. Microbiol.* 9, 2370.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02370>
- Garrigues, S., Gandía, M., Marcos, J.F., 2016. Occurrence and function of fungal antifungal proteins: a case study of the citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2243–2256. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7110-3>
- Geiser, D., Klich, M., Frisvad, J., Peterson, S., Varga, J., Samson, R., 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.01>
- Geiser, D.M., Pitt, J.I., Taylor, J.W., 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 388–393. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.388>
- Geiser, D.M., Timberlake, W.E., Arnold, M.L., 1996. Loss of meiosis in *Aspergillus*. *Mol. Biol. Evol.* 13, 809–817. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025641>
- Geris, R., Simpson, T.J., 2009. Meroterpenoids produced by fungi. *Nat. Prod. Rep.* 26, 1063–1094. <https://doi.org/10.1039/b820413f>
- Glaser, N., Stopper, H., 2012. Patulin: Mechanism of genotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* 50, 1796–1801. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.096>
- Gow, N.A.R., 2005. Fungal genomics: forensic evidence of sexual activity. *Curr. Biol. CB* 15, R509-511. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.06.034>
- H**
- Harwig, J., Chen, Y.-K., Kennedy, B., Scott, P., 1973. Occurrence of Patulin and Patulin-Producing Strains of *Penicillium expansum* in Natural Rots of Apple in Canada. [https://doi.org/10.1016/S0315-5463\(73\)73959-6](https://doi.org/10.1016/S0315-5463(73)73959-6)
- Hayashi, H., 2005. Bioactive alkaloids of fungal origin. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 32, 549–609. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(05\)80064-X](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(05)80064-X)

- Hayashi, H., Matsumoto, H., Akiyama, K., 2004. New insecticidal compounds, communesins C, D and E, from *Penicillium expansum* link MK-57. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 753–756. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.753>
- He, Y., Cox, R.J., 2016. The molecular steps of citrinin biosynthesis in fungi. *Chem. Sci.* 7, 2119–2127. <https://doi.org/10.1039/c5sc04027b>
- Heitman, J., 2010. Evolution of eukaryotic microbial pathogens via covert sexual reproduction. *Cell Host Microbe* 8, 86–99. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.06.011>
- Herceg, Z., Režek Jambrak, A., Vukušić, T., Stulić, V., Stanzer, D., Milošević, S., 2015. The effect of high-power ultrasound and gas phase plasma treatment on *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. count in pure culture. *J. Appl. Microbiol.* 118, 132–141. <https://doi.org/10.1111/jam.12692>
- Hetherington, A.C., Raistrick, H., 1931. Studies in the Biochemistry of Micro-organisms. Part XIV.—On the production and chemical constitution of a new yellow colouring mater, citrinin, produced from glucose by *Penicillium*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Contain. Pap. Biol. Character* 220, 269–295. <https://doi.org/10.1098/rstb.1931.0025>
- Hoang, T.T.P., Borie, N., Gratia, A., Pouchus, Y.F., Roullier, C., Renault, J.H., Grovel, O., 2016. Investigation of optimal methods including pH-zone-refining centrifugal partition chromatography for the isolation of communesins from cultures of a marine-derived *Penicillium expansum*, in: *Planta Medica*. Presented at the Abstracts 9th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, JSP, PSE & SIF, Georg Thieme Verlag KG, p. P602. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1596660>
- Hoff, B., Kamerewerd, J., Sigl, C., Mitterbauer, R., Zadra, I., Kürnsteiner, H., Kück, U., 2010. Two Components of a velvet-Like Complex Control Hyphal Morphogenesis, Conidiophore Development, and Penicillin Biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Eukaryot. Cell* 9, 1236–1250. <https://doi.org/10.1128/EC.00077-10>

- Horn, S.S., Bayen, U.J., Smith, R.E., 2011. What can the diffusion model tell us about prospective memory? *Can. J. Exp. Psychol. Rev. Can. Psychol. Exp.* 65, 69–75. <https://doi.org/10.1037/a0022808>
- Houbraken, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2011. Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina*. *Stud. Mycol.* 70, 53–138. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.02>
- Houbraken, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2010. Sex in *Penicillium* series *Roqueforti*. *IMA Fungus* 1, 171–180. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2010.01.02.10>
- Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C.M., Yilmaz, N., Wang, X.-C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Bensch, K., Samson, R.A., Frisvad, J.C., 2020. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Stud. Mycol., Genera of Hyphomycetes: a Tribute to Keith A. Seifert* 95, 5–169. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>
- Houbraken, J., Wang, L., Lee, H.B., Frisvad, J.C., 2016. New sections in *Penicillium* containing novel species producing patulin, pyripyropens or other bioactive compounds. *Persoonia* 36, 299–314. <https://doi.org/10.3767/003158516X692040>
- Huang, H., Niu, Y., Jin, Q., Qin, K., Wang, L., Shang, Y., Zeng, B., Hu, Z., 2022. Identification of Six Thiolases and Their Effects on Fatty Acid and Ergosterol Biosynthesis in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 88, e0237221. <https://doi.org/10.1128/aem.02372-21>
- I**
- Ishiuchi, K., Nakazawa, T., Yagishita, F., Mino, T., Noguchi, H., Hotta, K., Watanabe, K., 2013. Combinatorial generation of complexity by redox enzymes in the chaetoglobosin A biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* <https://doi.org/10.1021/ja402828w>
- Ismail, A., Papenbrock, J., 2015. Mycotoxins: Producing Fungi and Mechanisms of Phytotoxicity. *Agriculture* 5, 492–537. <https://doi.org/10.3390/agriculture5030492>

Ismail, A.A., Bassyouni, R.H., Kamel, Z., Gabr, S.M., 2016. Detoxification of Patulin by Kombucha tea culture. *CYTA - J. Food* 14, 271–279.

Izaguirre, G., Hwang, C.J., Krasner, S., McGuire, M., 1982. Geosmin and 2-Methylisoborneol from Cyanobacteria in Three Water Supply Systems. *Appl. Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/aem.43.3.708-714.1982>

J

Janisiewicz, W.J., Korsten, L., 2002. Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 411–441. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120401.130158>

Jiang, J., Yun, Y., Liu, Y., Ma, Z., 2012. FgVELB is associated with vegetative differentiation, secondary metabolism and virulence in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet. Biol.* 49, 653–662. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.06.005>

Jonge, R. de, Thomma, B., 2009. Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.01.002>

Jurick, W., Peng, H., Beard, H., Garrett, W., Lichtner, F.J., Luciano-Rosario, D., Macarasin, O., Liu, Y., Peter, K., Gaskins, V., Yang, T., Mowery, J., Bauchan, G., Keller, N., Cooper, B., 2019. Blistering1 Modulates *Penicillium expansum* Virulence Via Vesicle-mediated Protein Secretion*. *Mol. Cell. Proteomics.* <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001831>

Jurick, W.M., Peng, H., Beard, H.S., Garrett, W.M., Lichtner, F.J., Luciano-Rosario, D., Macarasin, O., Liu, Y., Peter, K.A., Gaskins, V.L., Yang, T., Mowery, J., Bauchan, G., Keller, N.P., Cooper, B., 2020. Blistering1 Modulates *Penicillium expansum* Virulence Via Vesicle-mediated Protein Secretion. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 19, 344–361. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001831>

Jurick, W.M., Vico, I., Gaskins, V.L., Garrett, W.M., Whitaker, B.D., Janisiewicz, W.J., Conway, W.S., 2010. Purification and Biochemical Characterization of

Polygalacturonase Produced by *Penicillium expansum* During Postharvest Decay of ‘Anjou’ Pear. *Phytopathology*® 100, 42–48. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-1-0042>

Jurick, W.M., Vico, I., Gaskins, V.L., Whitaker, B.D., Garrett, W.M., Janisiewicz, W.J., Conway, W.S., 2012. *Penicillium solitum* produces a polygalacturonase isozyme in decayed Anjou pear fruit capable of macerating host tissue in vitro. *Mycologia* 104, 604–612. <https://doi.org/10.3852/11-119>

K

Käfer, E., 1965. Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52, 217–232. <https://doi.org/10.1093/genetics/52.1.217>

Kale, S.P., Milde, L., Trapp, M.K., Frisvad, J.C., Keller, N.P., Bok, J.W., 2008. Requirement of *LaeA* for secondary metabolism and sclerotial production in *Aspergillus flavus*. *Fungal Genet. Biol.* 45, 1422–1429. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.06.009>

Karaffa, L., Sándor, E., Fekete, E., Szentirmai, A., 2001. The biochemistry of citric acid of accumulation by *Aspergillus niger* (A review). <https://doi.org/10.1556/AMICR.48.2001.3-4.11>

Kato, N., Brooks, W., Calvo, A.M., 2003. The Expression of *Sterigmatocystin* and *Penicillin* Genes in *Aspergillus nidulans* Is Controlled by *veA*, a Gene Required for Sexual Development. *Eukaryot. Cell* 2, 1178–1186. <https://doi.org/10.1128/EC.2.6.1178-1186.2003>

Kebly, M., Bernhoft, A., Höfer, C.C., Morrison, E., Larsen, H.J.S., Flåøyen, A., 2004. The effects of the *Penicillium* mycotoxins citrinin, cyclopiazonic acid, ochratoxin A, patulin, penicillic acid, and roquefortine C on in vitro proliferation of porcine lymphocytes. *Mycopathologia* 158, 317. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-5523-8>

- Keller, N.P., 2019. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 167–180. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1>
- Kerzaon, I., Pouchus, Y.F., Monteau, F., Le Bizec, B., Nourrisson, M.-R., Biard, J.-F., Grovel, O., 2009. Structural investigation and elucidation of new communesins from a marine-derived *Penicillium expansum* Link by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 23, 3928–3938. <https://doi.org/10.1002/rcm.4330>
- Kim, H., Han, K., Kim, K., Han, D.-M., Jahng, K., Chae, K., 2002. The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* FG B. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00029-4](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00029-4)
- Kim, H.Y., Heo, D.Y., Park, H.M., Singh, D., Lee, C.H., 2016. Metabolomic and Transcriptomic Comparison of Solid-State and Submerged Fermentation of *Penicillium expansum* KACC 40815. *PLoS ONE* 11, e0149012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149012>
- Kim, H.Y., Park, H.M., Lee, C.H., 2012. Mass spectrometry-based chemotaxonomic classification of *Penicillium* species (*P. echinulatum*, *P. expansum*, *P. solitum*, and *P. oxalicum*) and its correlation with antioxidant activity.
- King, G.S., Waight, E.S., Mantle, P.G., Szczyrbak, C.A., 1977. The structure of clavicipitic acid, an azepinoindole derivative from *Claviceps fusiformis*. *J. Chem. Soc. Perkin 1* 2099–2103. <https://doi.org/10.1039/P19770002099>
- Kopke, K., Hoff, B., Bloemendal, S., Katschorowski, A., Kamerewerd, J., Kück, U., 2013. Members of the *Penicillium chrysogenum* Velvet Complex Play Functionally Opposing Roles in the Regulation of Penicillin Biosynthesis and Conidiation. *Eukaryot. Cell* 12, 299–310. <https://doi.org/10.1128/EC.00272-12>

- Kopp-Holtwiesche, B., Rehm, H.J., 1990. Antimicrobial action of roquefortine. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 10, 41–44.
- Kosalková, K., Domínguez-Santos, R., Coton, M., Coton, E., García-Estrada, C., Liras, P., Martín, J.F., 2015. A natural short pathway synthesizes roquefortine C but not meleagrín in three different *Penicillium roqueforti* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 7601–7612. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6676-0>
- Kosalková, K., García-Estrada, C., Ullán, R.V., Godio, R.P., Feltrer, R., Teixeira, F., Mauriz, E., Martín, J.F., 2009. The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie* 91, 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.09.004>
- Kozlovskiĭ, A.G., Zhelifonova, V.P., Adanin, V.M., Antipova, T.V., Shnyreva, A.V., Viktorov, A.N., 2002. [The biosynthesis of low-molecular-weight nitrogen-containing secondary metabolite-alkaloids by the resident strains of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium expansum* isolated on the board of the Mir space station]. *Mikrobiologiya* 71, 773–777.
- Kozlovsky, A.G., Reshetilova, T.A., 1984. Regulation of the biosynthesis of ergot alkaloids by *Penicillium sizovae*. *Folia Microbiol. (Praha)* 29, 301–305. <https://doi.org/10.1007/BF02875961>
- Kozlovsky, A.G., Solovieva, T.F., Reshetilova, T.A., Skryabin, G.K., 1981. Biosynthesis of roquefortine and 3,12-dihydroroquefortine by the culture *Penicillium farinosum*. *Experientia* 37, 472–473. <https://doi.org/10.1007/BF01986141>
- Kozlovsky, A.G., Zhelifonova, V.P., Adanin, V.M., Antipova, T.V., Ozerskaya, S.M., Ivanushkina, N.E., Grafe, U., 2003. *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx 1901: Producer of Diketopiperazine Alkaloids (Roquefortine and 3,12-Dihydroroquefortine), Isolated from Permafrost. *Appl. Biochem. Microbiol.* 39, 393–397. <https://doi.org/10.1023/A:1024572602458>

- Kumar, D., Barad, S., Chen, Y., Luo, X., Tannous, J., Dubey, A., Glam Matana, N., Tian, S., Li, B., Keller, N., Prusky, D., 2016. LaeA regulation of secondary metabolism modulates virulence in *Penicillium expansum* and is mediated by sucrose. *Mol. Plant Pathol.* 18, 1150–1163. <https://doi.org/10.1111/mpp.12469>
- Kumar, D., Tannous, J., Sionov, E., Keller, N., Prusky, D., 2018. Apple Intrinsic Factors Modulating the Global Regulator, LaeA, the Patulin Gene Cluster and Patulin Accumulation During Fruit Colonization by *Penicillium expansum*. *Front. Plant Sci.* 9.
- Kyriakidis, N., Waight, E.S., Day, J.B., Mantle, P.G., 1981. Novel metabolites from *Penicillium crustosum*, including penitrem E, a tremorgenic mycotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 61–62. <https://doi.org/10.1128/aem.42.1.61-62.1981>
- L**
- La Guerche, S., Chamont, S., Blancard, D., Dubourdieu, D., Darriet, P., 2005. Origin of (–)-Geosmin on Grapes: On the Complementary Action of Two Fungi, *Botrytis Cinerea* and *Penicillium Expansum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 88, 131–139. <https://doi.org/10.1007/s10482-005-3872-4>
- Lan, N., Zhang, H., Hu, C., Wang, W., Calvo, A.M., Harris, S.D., Chen, S., Li, S., 2014. Coordinated and distinct functions of velvet proteins in *Fusarium verticillioides*. *Eukaryot. Cell* 13, 909–918. <https://doi.org/10.1128/EC.00022-14>
- Larsen, T.O., Frisvad, J., Ravn, G., Skaaning, T., 1998. Mycotoxin production by *Penicillium expansum* on blackcurrant and cherry juice. *Food Addit. Contam.* <https://doi.org/10.1080/02652039809374696>
- Larsen, T.O., Svendsen, A., Smedsgaard, J., 2001. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3630–3635. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3630-3635.2001>

- Lee, B.N., Adams, T.H., 1996. FluG and flbA function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through brlA beta activation. *EMBO J.* 15, 299–309.
- Lee, S.C., Ni, M., Li, W., Shertz, C., Heitman, J., 2010. The Evolution of Sex: a Perspective from the Fungal Kingdom. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 74, 298–340. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-10>
- Levin, E., Ballester, A.R., Raphael, G., Feigenberg, O., Liu, Y., Norelli, J., Gonzalez-Candelas, L., Ma, J., Dardick, C., Wisniewski, M., Droby, S., 2017. Identification and characterization of LysM effectors in *Penicillium expansum*. *PloS One* 12, e0186023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186023>
- Levin, E., Kishore, A., Ballester, A.R., Raphael, G., Feigenberg, O., Liu, Y., Norelli, J., Gonzalez-Candelas, L., Wisniewski, M., Droby, S., 2019. Identification of pathogenicity-related genes and the role of a subtilisin-related peptidase S8 (PePRT) in autophagy and virulence of *Penicillium expansum* on apples.
- Li, B., Chen, Y., Zhang, Z., Qin, G., Chen, T., Tian, S., 2020. Molecular basis and regulation of pathogenicity and patulin biosynthesis in *Penicillium expansum*. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12612>
- Li, B., Chen, Y., Zong, Y., Shang, Y., Zhang, Z., Xu, X., Wang, X., Long, M., Tian, S., 2019. Dissection of patulin biosynthesis, spatial control and regulation mechanism in *Penicillium expansum*. *Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14542>
- Li, B., Zong, Y., Du, Z., Chen, Y., Zhang, Z., Qin, G., Zhao, W., Tian, S., 2015. Genomic Characterization Reveals Insights Into Patulin Biosynthesis and Pathogenicity in *Penicillium* Species. *Mol. Plant-Microbe Interactions®* 28, 635–647. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-14-0398-FI>

- Li, H., Xiao, J., Gao, Y.-Q., Tang, J.J., Zhang, A.-L., Gao, J.-M., 2014. Chaetoglobosins from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus in *Ginkgo biloba*, and their phytotoxic and cytotoxic activities. *J. Agric. Food Chem.* 62, 3734–3741. <https://doi.org/10.1021/jf500390h>
- Li, T., Jiang, G., Qu, H., Wang, Y., Xiong, Y., Jian, Q., Wu, Y., Duan, X., Zhu, X., Hu, W., Wang, J., Gong, L., Jiang, Y., 2017. Comparative Transcriptome Analysis of *Penicillium citrinum* Cultured with Different Carbon Sources Identifies Genes Involved in Citrinin Biosynthesis. *Toxins* 9, E69. <https://doi.org/10.3390/toxins9020069>
- Li, Y., Xu, Y., Huang, Z., 2011. Isolation and characterization of the citrinin biosynthetic gene cluster from *Monascus aurantiacus*. *Biotechnol. Lett.* <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0745-y>
- Lin, H.-C., Chiou, G., Chooi, Y.-H., McMahon, T.C., Xu, W., Garg, N.K., Tang, Y., 2015. Elucidation of the concise biosynthetic pathway of the communesin indole alkaloids. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 54, 3004–3007. <https://doi.org/10.1002/anie.201411297>
- Long, N., Xu, X., Zeng, Q., Sang, H., Lu, L., 2017. Erg4A and Erg4B Are Required for Conidiation and Azole Resistance via Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e02924-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02924-16>
- López-Berges, M.S., Hera, C., Sulyok, M., Schäfer, K., Capilla, J., Guarro, J., Di Pietro, A., 2013. The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Mol. Microbiol.* 87, 49–65. <https://doi.org/10.1111/mmi.12082>
- Luciano-Rosario, D., Keller, N.P., Jurick, W.M., 2020. *Penicillium expansum*: biology, omics, and management tools for a global postharvest pathogen causing blue mould of pome fruit. *Mol. Plant Pathol.* 21, 1391–1404. <https://doi.org/10.1111/mpp.12990>

- Luque, M.I., Córdoba, J.J., Rodríguez, A., Núñez, F., Andrade, M.J., 2013. Development of a PCR protocol to detect ochratoxin A producing moulds in food products. *Food Control* 29, 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.023>
- Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, C., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., Padamsee, M., Hibbett, D., James, T., Baloch, E., 2004. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *Am. J. Bot.* 91, 1446–1480.
- Lv, X.-C., Huang, Z.-Q., Zhang, W., Rao, P., Ni, L., 2012. Identification and characterization of filamentous fungi isolated from fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine brewing. *J. Gen. Appl. Microbiol.* <https://doi.org/10.2323/JGAM.58.33>

M

- Mahunu, G., Zhang, H., Yang, Q., Li, C., Zheng, X., 2015. Biological Control of Patulin by Antagonistic Yeast: A case study and possible model. *Crit. Rev. Microbiol.* 42, 1–13. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1009823>
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V., 2013. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 60, 218–237. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>
- Martín, J.F., 2000. Molecular control of expression of penicillin biosynthesis genes in fungi: regulatory proteins interact with a bidirectional promoter region. *J. Bacteriol.* 182, 2355–2362. <https://doi.org/10.1128/JB.182.9.2355-2362.2000>
- Martín, J.F., Liras, P., 2016. Evolutionary formation of gene clusters by reorganization: the meleagrín/roquefortine paradigm in different fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 1579–1587. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7192-y>
- Martínez-Culebras, P.V., Gandía, M., Garrigues, S., Marcos, J.F., Manzanares, P., 2021. Antifungal Peptides and Proteins to Control Toxigenic Fungi and Mycotoxin Biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 13261. <https://doi.org/10.3390/ijms222413261>

- Martins, M.L., Gimeno, A., Martins, H.M., Fernando, B., 2002. Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. *Food Addit. Contam.* 19, 568–74. <https://doi.org/10.1080/02652030210121320>
- Massias, M., Rebuffat, S., Molho, L., Chiaroni, A., Riche, C., Bodo, B., 1990. Expansolides A and B: Tetracyclic sesquiterpene lactones from *Penicillium expansum*. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 8112–8115. <https://doi.org/10.1021/ja00178a039>
- Matsuda, Y., Awakawa, T., Abe, I., 2013. Reconstituted biosynthesis of fungal meroterpenoid andrastin A. *Tetrahedron* 69, 8199–8204. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.07.029>
- Matsuda, Y., Quan, Z., Mitsuhashi, T., Li, C., Abe, I., 2016. Cytochrome P450 for Citreohybridonol Synthesis: Oxidative Derivatization of the Andrastin Scaffold. *Org. Lett.* <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b03465>
- Mattheis, J., Roberts, R.G., 1992. Identification of geosmin as a volatile metabolite of *Penicillium expansum*. *Appl. Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/aem.58.9.3170-3172.1992>
- Melin, P., Schnürer, J., Wagner, E.G.H., 2003. Characterization of phiA, a gene essential for phialide development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 40, 234–241. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(03\)00108-7](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(03)00108-7)
- Melo, N., Wolff, G.H., Costa-da-Silva, A.L., Arribas, R., Triana, M.F., Gugger, M., Riffell, J.A., DeGennaro, M., Stensmyr, M.C., 2020. Geosmin Attracts *Aedes aegypti* Mosquitoes to Oviposition Sites. *Curr. Biol.* CB 30, 127-134.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.002>
- Merhej, J., Urban, M., Dufresne, M., Hammond-Kosack, K.E., Richard-Forget, F., Barreau, C., 2012. The velvet gene, FgVe1, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant Pathol.* 13, 363–374. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00755.x>

- MERHEJ, J., URBAN, M., DUFRESNE, M., HAMMOND-KOSACK, K.E., RICHARD-FORGET, F., BARREAU, C., 2011. The velvet gene, FgVe1, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant Pathol.* 13, 363–374. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00755.x>
- Meyers, D.M., Obrian, G., Du, W.L., Bhatnagar, D., Payne, G.A., 1998. Characterization of aflJ, a Gene Required for Conversion of Pathway Intermediates to Aflatoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3713–3717.
- Mirabito, P., Adams, T., Timberlake, W., 1989. Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in aspergillus development. *Cell.* [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90800-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90800-3)
- Moake, M., Padilla-Zakour, O., Worobo, R., 2005. Comprehensive Review of Patulin Control Methods in Foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* <https://doi.org/10.1111/J.1541-4337.2005.TB00068.X>
- Mooney, J.L., Yager, L.N., 1990. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.* 4, 1473–1482. <https://doi.org/10.1101/gad.4.9.1473>
- Moretti, A., Logrieco, A.F., Susca, A., 2017. Mycotoxins: An Underhand Food Problem. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1542, 3–12. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_1
- Moss, M. o., 2008. Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1239–1243. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03705.x>
- Mueller, G.M., Schmit, J.P., 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodivers. Conserv.* 16, 1–5. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9117-7>
- Mukherjee, A., Verma, J.P., Gaurav, A.K., Chouhan, G.K., Patel, J.S., Hesham, A.E.-L., 2020. Yeast a potential bio-agent: future for plant growth and postharvest disease management

- for sustainable agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 1497–1510.
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10321-3>
- Muro-Cach, C.A., Stedeford, T., Banasik, M., Suchecki, T.T., Persad, A.S., 2004. MYCOTOXINS: MECHANISMS OF TOXICITY AND METHODS OF DETECTION FOR IDENTIFYING EXPOSED INDIVIDUALS. *J. Land Use Environ. Law* 19, 537–556.
- Myung, K., Zitomer, N.C., Duvall, M., Glenn, A.E., Riley, R.T., Calvo, A.M., 2012. The conserved global regulator VeA is necessary for symptom production and mycotoxin synthesis in maize seedlings by *Fusarium verticillioides*. *Plant Pathol.* 61, 152–160.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02504.x>
- N**
- Navarro-Bordonaba, J., Adams, T., 1994. Development of Conidia and Fruiting Bodies in Ascomycetes. https://doi.org/10.1007/978-3-662-11908-2_20
- Nešić, K., Habschied, K., Mastanjević, K., 2021. Possibilities for the Biological Control of Mycotoxins in Food and Feed. *Toxins* 13, 198. <https://doi.org/10.3390/toxins13030198>
- Ni, M., Yu, J.-H., 2007. A Novel Regulator Couples Sporogenesis and Trehalose Biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* 2, e970.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000970>
- Nielsen, K.F., Dalsgaard, P.W., Smedsgaard, J., Larsen, T.O., 2005. Andrastins A-D, *Penicillium roqueforti* metabolites consistently produced in blue mold fermented cheese. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2908–2913.
- Nielsen, K.F., Sumarah, M.W., Frisvad, J.C., Miller, J.D., 2006. Production of metabolites from the *Penicillium roqueforti* complex. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3756–3763.
<https://doi.org/10.1021/jf060114f>

Numata, A., Takahashi, C., Ito, Y., Takada, T., Kawai, K., Usami, Y., Matsumura, E., Imachi, M., Ito, T., Hasegawa, T., 1993. Communesins, cytotoxic metabolites of a fungus isolated from a marine alga. *Tetrahedron Lett.*, The International Journal for the Rapid Publication of Preliminary 34, 2355–2358. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)77612-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)77612-X)

O

O'Brien, M., Nielsen, K.F., O'Kiely, P., Forristal, P.D., Fuller, H.T., Frisvad, J.C., 2006. Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9268–9276. <https://doi.org/10.1021/jf0621018>

Ohmomo, S., Ōhashi, T., Abe, M., 1980. Isolation of Biogenetically Correlated Four Alkaloids from the Cultures of *Penicillium corymbiferum*. *Agric. Biol. Chem.* 44, 1929–1930. <https://doi.org/10.1080/00021369.1980.10864236>

Oiartzabal-Arano, E., Perez-de-Nanclares-Arregi, E., Espeso, E.A., Etxebeste, O., 2016. Apical control of conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* 62, 371–377. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0556-0>

Ojeda-López, M., Chen, W., Eagle, C.E., Gutiérrez, G., Jia, W.L., Swilaiman, S.S., Huang, Z., Park, H.-S., Yu, J.-H., Cánovas, D., Dyer, P.S., 2018. Evolution of asexual and sexual reproduction in the aspergilli. *Stud. Mycol.* 91, 37–59. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.10.002>

Okeke, Boniface., Seigle-Murandi, Françoise., Steiman, Régine., Benoit-Guyod, J.Louis., Kaouadji, Mourad., 1993. Identification of mycotoxin-producing fungal strains: A step in the isolation of compounds active against rice fungal diseases. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1731–1735. <https://doi.org/10.1021/jf00034a040>

- Omura, S., Inokoshi, J., Uchida, R., Shiomi, K., Masuma, R., Kawakubo, T., Tanaka, H., Iwai, Y., Kosemura, S., Yamamura, S., 1996. Andrastins A-C, new protein farnesyltransferase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FO-3929. I. Producing strain, fermentation, isolation, and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)* 49, 414–417. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.49.414>
- Overy, D., Larsen, T.O., Dalsgaard, P., Frydenvang, K., Phipps, R., Munro, M., Christophersen, C., 2005. Andrastin A and barceloneic acid metabolites, protein farnesyl transferase inhibitors from *Penicillium albocoremium*: Chemotaxonomic significance and pathological implications. *Mycol. Res.* 109, 1243–9. <https://doi.org/10.1017/S0953756205003734>
- Overy, D.P., Frisvad, J.C., 2003. New *Penicillium* species associated with bulbs and root vegetables. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 631–639. <https://doi.org/10.1078/072320203770865945>

P

- Palmieri, D., Miccoli, C., Notardonato, I., Avino, P., Lima, G., De Curtis, F., Ianiri, G., Castoria, R., 2022. Modulation of extracellular *Penicillium expansum*-driven acidification by *Papiliotrema terrestris* affects biosynthesis of patulin and has a possible role in biocontrol activity. *Front. Microbiol.* 13, 973670. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.973670>
- Paoletti, M., Seymour, F.A., Alcocer, M.J.C., Kaur, N., Calvo, A.M., Archer, D.B., Dyer, P.S., 2007. Mating Type and the Genetic Basis of Self-Fertility in the Model Fungus *Aspergillus nidulans*. *Curr. Biol.* 17, 1384–1389. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.07.012>
- Paris, S., Debeaupuis, J.-P., Cramer, R., Carey, M., Charlès, F., Prévost, M.C., Schmitt, C., Philippe, B., Latgé, J.P., 2003. Conidial Hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl.*

- Environ. Microbiol. 69, 1581–1588. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1581-1588.2003>
- Park, H.-S., Bayram, Ö., Braus, G.H., Kim, S.C., Yu, J.-H., 2012a. Characterization of the velvet regulators in *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* 86, 937–953. <https://doi.org/10.1111/mmi.12032>
- Park, H.-S., Ni, M., Jeong, K.C., Kim, Y.H., Yu, J.-H., 2012b. The Role, Interaction and Regulation of the Velvet Regulator VelB in *Aspergillus nidulans*. *PLOS ONE* 7, e45935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045935>
- Park, H.-S., Yu, J.-H., 2016. Developmental regulators in *Aspergillus fumigatus*. *J. Microbiol. Seoul Korea* 54, 223–231. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-5619-5>
- Park, H.-S., Yu, J.-H., 2012. Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 669–677. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.09.006>
- Paster, N., Huppert, D., Barkai-Golan, R., 1995. Production of patulin by different strains of *Penicillium expansum* in pear and apple cultivars stored at different temperatures and modified atmospheres. *Food Addit. Contam.* 12, 51–58. <https://doi.org/10.1080/02652039509374278>
- Paterson, R.R.M., 2004. The isoeoxydon dehydrogenase gene of patulin biosynthesis in cultures and secondary metabolites as candidate PCR inhibitors. *Mycol. Res.* 108, 1431–1437. <https://doi.org/10.1017/s095375620400142x>
- Paterson, R.R.M., Simmonds, M.S.J., Blaney, W.M., 1987. Mycotoxic effects of characterized extracts of *Penicillium* isolates and purified secondary metabolites (including mycotoxins) on *Drosophila melanogaster* and *Spodoptera littoralis*. *J. Invertebr. Pathol.* 50, 124–133. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(87\)90112-1](https://doi.org/10.1016/0022-2011(87)90112-1)
- Pel, H.J., de Winde, J.H., Archer, D.B., Dyer, P.S., Hofmann, G., Schaap, P.J., Turner, G., de Vries, R.P., Albang, R., Albermann, K., Andersen, M.R., Bendtsen, J.D., Benen, J.A.E.,

- van den Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M.X., Contreras, R., Cornell, M., Coutinho, P.M., Danchin, E.G.J., Debets, A.J.M., Dekker, P., van Dijck, P.W.M., van Dijk, A., Dijkhuizen, L., Driessen, A.J.M., d'Enfert, C., Geysens, S., Goosen, C., Groot, G.S.P., de Groot, P.W.J., Guillemette, T., Henrissat, B., Herweijer, M., van den Hombergh, J.P.T.W., van den Hondel, C.A.M.J.J., van der Heijden, R.T.J.M., van der Kaaij, R.M., Klis, F.M., Kools, H.J., Kubicek, C.P., van Kuyk, P.A., Lauber, J., Lu, X., van der Maarel, M.J.E.C., Meulenberg, R., Menke, H., Mortimer, M.A., Nielsen, J., Oliver, S.G., Olsthoorn, M., Pal, K., van Peij, N.N.M.E., Ram, A.F.J., Rinas, U., Roubos, J.A., Sagt, C.M.J., Schmoll, M., Sun, J., Ussery, D., Varga, J., Vervecken, W., van de Vondervoort, P.J.J., Wedler, H., Wösten, H.A.B., Zeng, A.-P., van Ooyen, A.J.J., Visser, J., Stam, H., 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat. Biotechnol.* 25, 221–231. <https://doi.org/10.1038/nbt1282>
- Pessoni, R., Tersarotto, C., Mateus, C., Zerlin, J., Simões, K., Figueiredo-Ribeiro, R.D.C., Braga, M., 2015. Fructose affecting morphology and inducing β -fructofuranosidases in *Penicillium janczewskii*. *SpringerPlus* 4, 487. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1298-7>
- Pinedo, C., Wright, S.A.I., Collado, I.G., Goss, R.J.M., Castoria, R., Hrelia, P., Maffei, F., Durán-Patrón, R., 2018. Isotopic Labeling Studies Reveal the Patulin Detoxification Pathway by the Biocontrol Yeast *Rhodotorula kratochvilovae* LS11. *J. Nat. Prod.* 81, 2692–2699. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00539>
- Pitt, J., 1987. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of Ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 266–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.53.2.266-269.1987>

Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*. Springer US, Boston, MA.
<https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>

Prusky, D., McEvoy, J., Saftner, R., Conway, W., Jones, R., 2004. Relationship Between Host Acidification and Virulence of *Penicillium* spp. on Apple and Citrus Fruit. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.1.44>

Puel, O., Galtier, P., Oswald, I.P., 2010. Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins* 2, 613–631. <https://doi.org/10.3390/toxins2040613>

Q

Qin, Y.-Y., Huang, X.-S., Liu, X.-B., Mo, T.-X., Xu, Z.-L., Li, B.-C., Qin, X.-Y., Li, J., Schäberle, T.F., Yang, R.-Y., 2022. Three new andrastin derivatives from the endophytic fungus *Penicillium vulpinum*. *Nat. Prod. Res.* 36, 3262–3270.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1853725>

R

Rai, M., Bonde, Dr.S., Ingle, A., Gade, A., 2012. Mycotoxin: Rapid Detection, Differentiation and Safety. *J. Pharm. Educ. Res.* 3, 22–34.

Ramirez-Prado, J.H., Moore, G.G., Horn, B.W., Carbone, I., 2008. Characterization and population analysis of the mating-type genes in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genet. Biol.* 45, 1292–1299.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.06.007>

Rauscher, S., Pacher, S., Hedtke, M., Kniemeyer, O., Fischer, R., 2016. A phosphorylation code of the *Aspergillus nidulans* global regulator VelvetA (VeA) determines specific functions. *Mol. Microbiol.* 99, 909–924. <https://doi.org/10.1111/mmi.13275>

Revilla, G., López-Nieto, M.J., Luengo, J.M., Martín, J.F., 1984. Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 37, 781–789. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.781>

- Ries, M.I., Ali, H., Lankhorst, P.P., Hankemeier, T., Bovenberg, R.A.L., Driessen, A.J.M., Vreeken, R.J., 2013. Novel Key Metabolites Reveal Further Branching of the Roquefortine/Meleagrins Biosynthetic Pathway. *J. Biol. Chem.* 288, 37289–37295. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.512665>
- Rodríguez-Urra, A.B., Jiménez, C., Nieto, M., Rodríguez, J., Hayashi, H., Ugalde, U., 2012. Signaling the induction of sporulation involves the interaction of two secondary metabolites in *Aspergillus nidulans*. *ACS Chem. Biol.* <https://doi.org/10.1021/cb200455u>
- Rojas-Aedo, J.F., Gil-Durán, C., Del-Cid, A., Valdés, N., Álamos, P., Vaca, I., García-Rico, R.O., Levicán, G., Tello, M., Chávez, R., 2017. The Biosynthetic Gene Cluster for Andrastin A in *Penicillium roqueforti*. *Front. Microbiol.* 8, 813. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00813>
- Roncal, T., Ugalde, U., 2003. Conidiation induction in *Penicillium*. *Res. Microbiol.* 154, 539–546. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00168-2](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00168-2)
- Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S., Dupont, J., 2012. A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *Int. J. Food Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.005>
- Ruger-Herreros, C., Corrochano, L.M., 2020. Conidiation in *Neurospora crassa*: vegetative reproduction by a model fungus. *Int. Microbiol.* 23, 97–105. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00085-1>
- Ruger-Herreros, C., Rodríguez-Romero, J., Fernández-Barranco, R., Olmedo, M., Fischer, R., Corrochano, L., Cánovas, D., 2011. Regulation of Conidiation by Light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics.* <https://doi.org/10.1534/genetics.111.130096>

S

- Samson, R., Varga, J., 2000. Molecular systematics of *Aspergillus* and its teleomorphs. *Aspergillus Mol. Biol. Genomics* 9–49.

- Samson, R.A., Peterson, S.W., Frisvad, J.C., Varga, J., 2011. New species in *Aspergillus* section *Terrei*. *Stud. Mycol.* 39–55. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.69.04>
- Sánchez-Torres, P., Vilanova, L., Ballester, A.R., López-Pérez, M., Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., González-Candelas, L., Torres, R., 2018. Unravelling the contribution of the *Penicillium expansum* PeSte12 transcription factor to virulence during apple fruit infection. *Food Microbiol.* 69, 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.005>
- Sanzani, S.M., Reverberi, M., Punelli, M., Ippolito, A., Fanelli, C., 2012. Study on the role of patulin on pathogenicity and virulence of *Penicillium expansum*. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.021>
- Sarikaya-Bayram, Ö., Palmer, J.M., Keller, N., Braus, G.H., Bayram, Ö., 2015. One Juliet and four Romeos: VeA and its methyltransferases. *Front. Microbiol.* 6.
- Schmidt-Heydt, M., Graf, E., Stoll, D., Geisen, R., 2012. The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism of adaptation to NaCl rich foods. *Food Microbiol.* 29, 233–41. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.003>
- Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C., Raupp, F., Lamprecht, A., Perrone, G., Geisen, R., 2011. Influence of light on food relevant fungi with emphasis on ochratoxin producing species. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 229–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.022>
- Schöller, C., Gürtler, H., Pedersen, R., Molin, S., Wilkins, K., 2002. Volatile metabolites from actinomycetes. *J. Agric. Food Chem.* <https://doi.org/10.1021/JF0116754>
- Schumann, J., Hertweck, C., 2007. Molecular Basis of Cytochalasan Biosynthesis in Fungi: Gene Cluster Analysis and Evidence for the Involvement of a PKS-NRPS Hybrid Synthase by RNA Silencing. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 9564–9565. <https://doi.org/10.1021/ja072884t>

- Scott, P.M., Kennedy, P.C., 1976. Analysis of blue cheese for roquefortine and other alkaloids from *Penicillium roqueforti*. *J. Agric. Food Chem.* 24, 865–868.
<https://doi.org/10.1021/jf60206a028>
- Scott, P.M., Merrien, M.-A., Polonsky, J., 1976. Roquefortine and isofumigaclavine A, metabolites from *Penicillium roqueforti*. *Experientia* 32, 140–142.
<https://doi.org/10.1007/BF01937728>
- Seibold, M., Wolschann, P., Bodevin, S., Olsen, O., 2011. Properties of the bubble protein, a defensin and an abundant component of a fungal exudate. *Peptides* 32, 1989–1995.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.08.022>
- Shimizu, T., Kinoshita, H., Nihira, T., 2007. Identification and in vivo functional analysis by gene disruption of *ctnA*, an activator gene involved in citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5097–5103.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01979-06>
- Smith, T.K., McMillan, E.G., Castillo, J.B., 1997. Effect of feeding blends of *Fusarium* mycotoxin-contaminated grains containing deoxynivalenol and fusaric acid on growth and feed consumption of immature swine. *J. Anim. Sci.* 75, 2184–2191.
<https://doi.org/10.2527/1997.7582184x>
- Snini, S., 2014. Éluclation de la voie de biosynthèse d'une mycotoxine, la patuline : caractérisation du cluster de gène et étude de la régulation (phd).
- Snini, S.P., Tannous, J., Heuillard, P., Bailly, S., Lippi, Y., Zehraoui, E., Barreau, C., Oswald, I.P., Puel, O., 2016a. Patulin is a cultivar-dependent aggressiveness factor favouring the colonization of apples by *Penicillium expansum*. *Mol. Plant Pathol.* 17, 920–930.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12338>
- Snini, S.P., Tannous, J., Heuillard, P., Bailly, S., Lippi, Y., Zehraoui, E., Barreau, C., Oswald, I.P., Puel, O., 2016b. Patulin is a cultivar-dependent aggressiveness factor favouring the

- colonization of apples by *Penicillium expansum*. *Mol. Plant Pathol.* 17, 920–930.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12338>
- Snini, S.P., Tannous, J., Heuillard, P., Bailly, S., Lippi, Y., Zehraoui, E., Barreau, C., Oswald, I.P., Puel, O., 2015. Patulin is a cultivar-dependent aggressiveness factor favouring the colonization of apples by *Penicillium expansum*. *Mol. Plant Pathol.* 17, 920–930.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12338>
- Solov'eva, T., Reshetilova, T., Baskunov, B., Griforian, K., Kozlovskii, A., 1995. [Alkaloids from *Penicillium* species fungi isolated from food products]. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 31, 545–50.
- Sommer, N.F., Buchanan, J.R., Fortlage, R.J., 1974. Production of patulin by *Penicillium expansum*. *Appl. Microbiol.* 28, 589–593. <https://doi.org/10.1128/am.28.4.589-593.1974>
- Son, Y.-E., Park, H.-S., 2021. Unveiling the Functions of the VosA-VelB Target Gene *vidD* in *Aspergillus nidulans*. *Mycobiology* 49, 258–266.
<https://doi.org/10.1080/12298093.2021.1926122>
- Sonjak, S., Frisvad, J., Gunde-cimerman, N., 2005. Comparison of secondary metabolite production by *Penicillium crustosum* strains, isolated from Arctic and other various ecological niches. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53, 51–60.
<https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.10.014>
- Speijers, G.J.A., Speijers, M.H.M., 2004. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicol. Lett.* 153, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.046>
- Steenwyk, J.L., Shen, X.-X., Lind, A.L., Goldman, G.H., Rokas, A., 2019. A Robust Phylogenomic Time Tree for Biotechnologically and Medically Important Fungi in the Genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *mBio* 10, e00925-19.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00925-19>

- Steiman, R., Seigle-Murandi, F., Sage, L., Krivobok, S., 1989. Production of patulin by Micromycetes. *Mycopathologia* 105, 129–133. <https://doi.org/10.1007/BF00437244>
- Steinchen, W., Lackner, G., Yasmin, S., Schrettl, M., Dahse, H.-M., Haas, H., Hoffmeister, D., 2013. Bimodular peptide synthetase SidE produces fumarylalanine in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6670–6676. <https://doi.org/10.1128/AEM.02642-13>
- Stinnett, S.M., Espeso, E., Cobeño, L., Araújo-Bazán, L., Calvo, A.M., 2007. *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin α carrier and on light. *Mol. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05506.x>
- Stoll, D.A., Link, S., Kulling, S., Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., 2014. Comparative proteome analysis of *Penicillium verrucosum* grown under light of short wavelength shows an induction of stress-related proteins associated with modified mycotoxin biosynthesis. *Int. J. Food Microbiol.* 175, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.010>
- Stott, W., Bullerman, L., 1975. Patulin: A Mycotoxin of Potential Concern in Foods1. <https://doi.org/10.4315/0022-2747-38.11.695>
- Streit, E., Naehrer, K., Rodrigues, I., Schatzmayr, G., 2013. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *J. Sci. Food Agric.* 93, 2892–2899. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6225>
- Sugui, J.A., Pardo, J., Chang, Y.C., Müllbacher, A., Zarembek, K.A., Galvez, E.M., Brinster, L., Zerfas, P., Gallin, J.I., Simon, M.M., Kwon-Chung, K.J., 2007. Role of *laeA* in the Regulation of *alb1*, *gliP*, Conidial Morphology, and Virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* 6, 1552–1561. <https://doi.org/10.1128/EC.00140-07>
- Svendsen, A., Frisvad, J.C., 1994. A chemotaxonomic study of the terverticillate penicillia based on high performance liquid chromatography of secondary metabolites. *Mycol. Res.* 98, 1317–1328. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80305-5](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80305-5)

T

- Tabuc, C., 2007. Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines (phd).
- Tannous, J., El Khoury, R., Snini, S.P., Lippi, Y., El Khoury, A., Atoui, A., Lteif, R., Oswald, I.P., Puel, O., 2014. Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from *Penicillium expansum*. *Int. J. Food Microbiol.* 189, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.028>
- Tannous, J., Keller, N.P., Atoui, A., El Khoury, A., Lteif, R., Oswald, I.P., Puel, O., 2018a. Secondary metabolism in *Penicillium expansum*: Emphasis on recent advances in patulin research. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58, 2082–2098. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1305945>
- Tannous, J., Keller, N.P., Atoui, A., El Khoury, A., Lteif, R., Oswald, I.P., Puel, O., 2018b. Secondary metabolism in *Penicillium expansum*: Emphasis on recent advances in patulin research. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58, 2082–2098. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1305945>
- Tannous, J., Snini, S.P., El Khoury, R., Canlet, C., Pinton, P., Lippi, Y., Alassane-Kpembé, I., Gauthier, T., El Khoury, A., Atoui, A., Zhou, T., Lteif, R., Oswald, I.P., Puel, O., 2017. Patulin transformation products and last intermediates in its biosynthetic pathway, E- and Z-ascladiol, are not toxic to human cells. *Arch. Toxicol.* 91, 2455–2467. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1900-y>
- Thohinung, S., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Kukongviriyapan, V., Tusskorn, O., Soyong, K., 2010. Cytotoxic 10-(indol-3-yl)-[13]cytochalasans from the fungus *Chaetomium elatum* ChE01. *Arch. Pharm. Res.* 33, 1135–1141. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-0801-5>

- Tiley, A.M.M., White, H.J., Foster, G.D., Bailey, A.M., 2019. The ZtvelB Gene Is Required for Vegetative Growth and Sporulation in the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Front. Microbiol.* 10.
- Torruella, G., de Mendoza, A., Grau-Bové, X., Antó, M., Chaplin, M.A., del Campo, J., Eme, L., Pérez-Cordón, G., Whipps, C.M., Nichols, K.M., Paley, R., Roger, A.J., Sitjà-Bobadilla, A., Donachie, S., Ruiz-Trillo, I., 2015. Phylogenomics Reveals Convergent Evolution of Lifestyles in Close Relatives of Animals and Fungi. *Curr. Biol.* CB 25, 2404–2410. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.053>
- Touhami, N., Soukup, S.T., Schmidt-Heydt, M., Kulling, S.E., Geisen, R., 2018. Citrinin as an accessory establishment factor of *P. expansum* for the colonization of apples. *Int. J. Food Microbiol.* 266, 224–233. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.007>
- V**
- Vansteelandt, M., Kerzaon, I., Blanchet, E., Fossi Tankoua, O., Robiou Du Pont, T., Joubert, Y., Monteau, F., Le Bizec, B., Frisvad, J.C., Pouchus, Y.F., Grovel, O., 2012. Patulin and secondary metabolite production by marine-derived *Penicillium* strains. *Fungal Biol.* 116, 954–961. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.06.005>
- Vilanova, L., Wisniewski, M., Norelli, J.L., Vinas, I., Torres, R., Usall, J., Phillips, J., Droby, S., Teixidó, N., 2014. Transcriptomic Profiling of Apple in Response to Inoculation with a Pathogen (*Penicillium expansum*) and a Non-pathogen (*Penicillium digitatum*). *Plant Mol. Biol. Report.* 32. <https://doi.org/10.1007/s11105-013-0676-y>
- Vinokurova, N., Boichenko, L., Arinbasarov, M., 2003. Production of Alkaloids by Fungi of the Genus *Penicillium* Grown on Wheat Grain. *Appl. Biochem. Microbiol.* 39, 403–406. <https://doi.org/10.1023/A:1024576703367>
- Visagie, C.M., Houbraken, J., Dijksterhuis, J., Seifert, K.A., Jacobs, K., Samson, R.A., 2016. A taxonomic review of *Penicillium* species producing conidiophores with solitary

phialides, classified in section *Torulomyces*. *Persoonia* 36, 134–155.
<https://doi.org/10.3767/003158516X690952>

W

Wagener, R.E., Davis, N.D., Diener, U.L., 1980. Penitrem A and Roquefortine Production by *Penicillium commune*. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 882–887.
<https://doi.org/10.1128/aem.39.4.882-887.1980>

Wang, G., Zhang, H., Wang, Y., Liu, F., Li, E., Ma, J., Yang, B., Zhang, C., Li, L., Liu, Y., 2019. Requirement of *LaeA*, *VeA*, and *VelB* on Asexual Development, Ochratoxin A Biosynthesis, and Fungal Virulence in *Aspergillus ochraceus*. *Front. Microbiol.* 10.

Wang, L., Zhang, Xianyan, Zhang, K., Zhang, Xiaomin, Zhu, T., Che, Q., Zhang, G., Li, D., 2020. Overexpression of Global Regulator *PbrlaeA* Leads to the Discovery of New Polyketide in Fungus *Penicillium Brocae* HDN-12-143. *Front. Chem.* 8.

Wang, Y., Wang, Y., Wang, Y., Wang, Y., Feng, K., Yang, H., Yang, H., Yang, H., Zhang, Z., Yuan, Y., Yuan, Y., Yuan, Y., Yue, T., Yue, T., Yue, T., Yue, T., 2018. Effect of Cinnamaldehyde and Citral Combination on Transcriptional Profile, Growth, Oxidative Damage and Patulin Biosynthesis of *Penicillium expansum*. *Front. Microbiol.* 9.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00597>

Watanabe, M., 2008. Production of mycotoxins by *Penicillium expansum* inoculated into apples. *J. Food Prot.* 71, 1714–1719. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.8.1714>

Webster, R.H., Sil, A., 2008. Conserved factors *Ryp2* and *Ryp3* control cell morphology and infectious spore formation in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 14573–14578. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806221105>

Welke, J.E., Hoeltz, M., Dottori, H., Noll, I., 2011. Patulin Accumulation In Apples During Storage by *Penicillium Expansum* and *Penicillium Griseofulvum* Strains. *Braz. J.*

- Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol. 42, 172–80. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000100021>
- Wieser, J., Lee, B.N., Fondon, J.W., Adams, T.H., 1994. Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* 27, 62–69. <https://doi.org/10.1007/BF00326580>
- Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J., Liu, J., Schena, L., 2016. Alternative management technologies for postharvest disease control: The journey from simplicity to complexity. *Postharvest Biol. Technol.*, Alternatives to the use of synthetic fungicides for the control of postharvest decay of fruit and vegetables: current status and future perspectives 122, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.05.012>
- Woo, P.C.Y., Chong, K.T.K., Tse, H., Cai, J.J., Lau, C.C.Y., Zhou, A.C., Lau, S.K.P., Yuen, K., 2006. Genomic and experimental evidence for a potential sexual cycle in the pathogenic thermal dimorphic fungus *Penicillium marneffeii*. *FEBS Lett.* 580, 3409–3416. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.05.014>
- Wu, C., Wu, X., Wen, C., Peng, bo, Peng, X., Chen, X., Li, H., 2016. Fructose promotes growth and antifungal activity of *Penicillium citrinum*. *Protein Cell* 7. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0280-7>
- Wu, M.-Y., Mead, M.E., Lee, M.-K., Neuhaus, G.F., Adpressa, D.A., Martien, J.I., Son, Y.-E., Moon, H., Amador-Noguez, D., Han, K.-H., Rokas, A., Loesgen, S., Yu, J.-H., Park, H.-S., 2021. Transcriptomic, Protein-DNA Interaction, and Metabolomic Studies of VosA, VelB, and WetA in *Aspergillus nidulans* Asexual Spores. *mBio* 12, e03128-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.03128-20>
- Y**
- Yager, L.N., 1992. Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol. USA*.

- Yamaguchi, T., Nozawa, K., Nakajima, S., Kawai, K., Udagawa, S., 1991. Absolute configuration of roquefortine C, a tremorgenic mycotoxin. *Mycotoxins* 1991, 29–32. https://doi.org/10.2520/myco1975.1991.34_29
- Yang, Q., Chen, Y., Ma, Z., 2013. Involvement of BcVeA and BcVelB in regulating conidiation, pigmentation and virulence in *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* 50, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.10.003>
- Ying, Y.-M., Fang, C.-A., Yao, F.-Q., Yu, Y., Shen, Y., Hou, Z.-N., Wang, Z., Zhang, W., Shan, W.-G., Zhan, Z.-J., 2017. Bergamotane Sesquiterpenes with Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity from the Plant Pathogenic Fungus *Penicillium expansum*. *Chem. Biodivers.* 14, e1600184. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600184>
- Yoder, O.C., 1980. Toxins in Pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18, 103–129. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.18.090180.000535>
- Young, W.F., Horth, H., Crane, R., Ogden, T., Arnott, M., 1996. Taste and odour threshold concentrations of potential potable water contaminants. *Water Res.* 30, 331–340. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00173-5](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00173-5)
- Yu, J., Han, H., Zhang, X., Ma, C., Sun, C., Che, Q., Gu, Q., Zhu, T., Zhang, G., Li, D., 2019. Discovery of Two New Sorbicillinoids by Overexpression of the Global Regulator LaeA in a Marine-Derived Fungus *Penicillium dipodomyis* YJ-11. *Mar. Drugs* 17, 446. <https://doi.org/10.3390/md17080446>

Z

- Zetina-Serrano, C., Rocher, O., Naylies, C., Lippi, Y., Oswald, I.P., Lorber, S., Puel, O., 2020a. The *brlA* Gene Deletion Reveals That Patulin Biosynthesis Is Not Related to Conidiation in *Penicillium expansum*. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6660. <https://doi.org/10.3390/ijms21186660>

- Zetina-Serrano, C., Rocher, O., Naylies, C., Lippi, Y., Oswald, I.P., Lorber, S., Puel, O., 2020b. The *brlA* Gene Deletion Reveals That Patulin Biosynthesis Is Not Related to Conidiation in *Penicillium expansum*. *Int. J. Mol. Sci.* 21, E6660. <https://doi.org/10.3390/ijms21186660>
- Zhang, J., Ge, H., Jiao, R., Li, J., Peng, H., Wang, Y.R., Wu, J., Song, Y., Tan, R., 2010. Cytotoxic chaetoglobosins from the endophyte *Chaetomium globosum*. *Planta Med.* <https://doi.org/10.1055/s-0030-1249936>
- Zhang, X., Zhu, Y., Bao, L., Gao, L., Yao, G., Li, Y., Yang, Z., Li, Z., Zhong, Y., Li, F., Yin, H., Qu, Y., Qin, Y., 2016. Putative methyltransferase *LaeA* and transcription factor *CreA* are necessary for proper asexual development and controlling secondary metabolic gene cluster expression. *Fungal Genet. Biol.* 94, 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.07.004>
- Zhang, Z., Jamieson, C.S., Zhao, Y.-L., Li, D., Ohashi, M., Houk, K.N., Tang, Y., 2019. Enzyme-catalyzed inverse-electron demand Diels-Alder reaction in the biosynthesis of antifungal ilicicolin H. *J. Am. Chem. Soc.* 141, 5659–5663. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b02204>
- Zhao, Y., Lee, M.-K., Lim, J., Moon, H., Park, H.-S., Zheng, W., Yu, J.-H., 2021. The putative sensor histidine kinase *VadJ* coordinates development and sterigmatocystin production in *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol. Seoul Korea* 59, 746–752. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-1055-2>
- Zheng, X., Yang, Q., Zhang, X., Apaliya, M.T., Ianiri, G., Zhang, H., Castoria, R., 2017. Biocontrol Agents Increase the Specific Rate of Patulin Production by *Penicillium expansum* but Decrease the Disease and Total Patulin Contamination of Apples. *Front. Microbiol.* 8, 1240. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01240>

- Zhong, L., Carere, J., Lu, Z., Lu, F., Zhou, T., 2018. Patulin in Apples and Apple-Based Food Products: The Burdens and the Mitigation Strategies. *Toxins* 10, 475.
<https://doi.org/10.3390/toxins10110475>
- Zhu, C., Wang, Y., Hu, X., Lei, M., Wang, M., Zeng, J., Li, H., Liu, Z., Zhou, T., Yu, D., 2020a. Involvement of LaeA in the regulation of conidia production and stress responses in *Penicillium digitatum*. *J. Basic Microbiol.* 60, 82–88.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201900367>
- Zhu, C., Wang, Y., Hu, X., Lei, M., Wang, M., Zeng, J., Li, H., Liu, Z., Zhou, T., Yu, D., 2020b. Involvement of LaeA in the regulation of conidia production and stress responses in *Penicillium digitatum*. *J. Basic Microbiol.* 60, 82–88.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201900367>

